Gesamtkreatininbestimmung von fleischextrakthaltigen Lebensmitteln mit einem gekoppelten Enzym-JAFFE-Farbtest im Mikromaßstab

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Klaus-Peter Rupp
aus Schwäbisch Gmünd

1984

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546514_0024

Gesamtkreatininbestimmung von fleischextrakthaltigen Lebensmitteln mit einem gekoppelten Enzym-JAFFE-Farbtest im Mikromaßstab

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Klaus-Peter Rupp
aus Schwäbisch Gmünd

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Februar 1984
Dekan: Professor Dr. H. Strähle
1. Berichterstatter: Professor Dr. K.-A. Kovar
2. Berichterstatter: Professor Dr. H.J. Roth

Die vorliegende Arbeit wurde im April 1981 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. K.-A. Kovar am Teilbereich Pharmazie der Fakultät für Chemie und Pharmazie begonnen und im Dezember 1983 abgeschlossen.

Für die wertvollen Anregungen und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit danke ich Herrn Professor Dr. K.-A. Kovar sehr herzlich.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1	Einleitung	1
2	Entwicklung einer Arbeitshypothese	4
2.1	Methoden der Gesamtkreatininbestimmung	4
2.1.1	Enzymatische Bestimmungen	4
2.1.2	Hochdruckflüssigkeitschromatographische und ionenaustauscherchromatographische Gesamtkreatininbestimmung	6
2.1.3	Auf der Reaktion nach JAFFE beruhende Methoden	6
2.2	Reaktionsmechanismus der JAFFE-Reaktion	7
2.2.1	Vorbemerkungen	7
2.2.2	Mechanismus nach ELLINGER, SEIDEL und KOVAR	8
2.2.3	Arbeiten von KOHASHI et al	10
2.3	Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus	11
2.3.1	Vorbemerkungen	11
2.3.2	^{1}H-NMR-Bestimmungen	12
2.3.2.1	Kreatinin	12
2.3.2.2	Kreatininpikrat	14
2.3.2.3	Trinitrocyclohexadienat-Addukt aus Pikrinsäure und Kreatinin	16
2.3.2.4	Propenid-Addukt	20
2.3.2.5	Diskussion der Signalverdopplung	23
2.3.3	^{13}C-NMR-Bestimmungen	27
2.3.3.1	Kreatinin	27
2.3.3.2	Pikrinsäure	27
2.3.3.3	Kreatininpikrat	29
2.3.3.4	Trinitrocyclohexadienat-Addukt	34
2.3.3.5	Propenid-Addukt	40
3	Entwicklung einer neuen Methode zur Gesamtkreatininbestimmung	43
3.1	Vorarbeiten	43
3.1.1	Methode SCHMID	43
3.1.2	Methode LÖHBERG	45
3.2	Ausarbeitung einer neuen Methode	46
3.2.1	Bestimmung der Pufferwirkung einer klaren Fleischsuppe	50

Seite

3.2.2 Messungen mit Tetraborat-Puffer (pH 9)..... 51
3.2.3 Geänderte Pufferlösung zur Bestimmung (Glycyl-glycin-Puffer pH 8)..... 52
3.2.4 Eichgeradenerstellung nach der neuen Methode.... 53
3.3 Bestimmung gesamtkreatininhaltiger Proben..... 53
3.3.1 Bestimmung nach der neuen Methode und der Methode LÖHBERG..... 53
3.3.2 Bestimmung des Gesamtkreatiningehalts nach der Methode HADORN..... 55
3.3.3 Bestimmung gesamtkreatininhaltiger Proben nach den Methoden SCHMID (Mikro), LÖHBERG und der neuen Methode..... 55
3.3.3.1 Fleischextrakt..... 55
3.3.3.2 Bestimmung einer klaren Fleischsuppe, eines Bratensaftes und einer gebundenen Ochsenschwanzsuppe und Vergleich mit dem deklarierten Wert... 56
3.3.4 Messung von 10 verschiedenen Proben nach der neuen Methode und Vergleich der Werte mit der HPLC-Methode..... 57

4 Allgemeiner Methodenvergleich..... 59
4.1 Vergleich der spezifischen Extinktion der neuen Methode mit den Methoden SCHMID, LÖHBERG und HADORN..... 59
4.2 Vergleich der Präzision..... 61
4.2.1 Präzision in Serie..... 61
4.2.2 Präzision von Tag zu Tag..... 61
4.3 Vergleich der neuen Methode mit anderen üblichen Methoden zur Gesamtkreatininbestimmung in der Lebensmittelchemie..... 62
4.4 Vorteile der neuen Methode zur Gesamtkreatininbestimmung..... 64

5 Zusammenfassung..... 65

6 Experimenteller Teil..... 68
6.1 Synthese und Isolierung der Verbindung 2b und von Kreatininpikrat..... 68
6.1.1 Versuch der Herstellung nach der Vorschrift von KOHASHI et al. 68

Seite

6.1.2 Synthese der Verbindung 2b in natronalkalisch-methanolischem Milieu..... 68
6.1.3 Herstellung von Kreatininpikrat (7)..... 69
6.2 Messung der UV/VIS-Absorption der MEISENHEIMER-Verbindung 2b..... 70
6.2.1 Messung in Wasser..... 70
6.2.2 Messung in 20proz. Natronlauge..... 70
6.2.3 Messung in Methanol..... 70
6.2.4 Messung der zeitlich fortschreitenden Zersetzung in Wasser..... 72
6.3 Infrarot-Spektren..... 73
6.4 Pipettierschema..... 75
6.4.1 Arbeitsvorschrift nach SCHMID..... 75
6.4.2 Arbeitsvorschrift für den kombinierten Enzym-JAFFE-Farbtest nach LÖHBERG..... 76
6.4.3 Pipettierschema der neuen Methode..... 77
6.5 Berechnung des Gesamtkreatiningehalts nach der neuen Methode..... 78
6.5.1 Angabe in mg/l verzehrfertiger Zubereitung..... 78
6.5.2 Angabe in Gewichtsprozent..... 78
6.6 Eichgeraden..... 79
6.6.1 Eichgeradenerstellung nach der neuen Methode.... 79
6.6.2 Eichgeradenerstellung nach der Methode HADORN... 80
6.7 Regressionsgeraden..... 81
6.7.1 Regressionsgerade der neuen Methode..... 81
6.7.2 Eichgerade der wäßrigen Kreatininlösung nach der Methode HADORN..... 82
6.8 Richtigkeit und Präzision..... 83
6.8.1 Bestimmung der Präzision..... 83
6.8.1.1 Präzision in Serie..... 84
6.8.1.2 Präzision von Tag zu Tag..... 85
6.8.2 Bestimmung der Richtigkeit..... 85
6.8.2.1 Mischversuche..... 85
6.8.2.2 Vergleichsversuche..... 86
6.9 Probenvorbehandlung..... 87
6.9.1 Neue Methode..... 87
6.9.1.1 Fleischextrakt..... 87

Seite

6.9.1.2 Klare Fleischsuppe, Bratensaft und gebundene Ochsenschwanzsuppe..... 87
6.9.2 Methoden SCHMID und LÖHBERG..... 88
6.9.2.1 Probenvorbereitung..... 88
6.9.2.2 Säurekatalytische Umwandlung des Kreatins in Kreatinin..... 88
6.10 Bestimmung des Gesamtkreatiningehalts eines Fleischextraktes nach den Methoden SCHMID, LÖHBERG und der neuen Methode..... 89
6.10.1 Methode SCHMID (Mikro-Verfahren)..... 89
6.10.2 Methode LÖHBERG..... 89
6.10.3 Neue Methode..... 89
6.11 Bestimmung des Gesamtkreatiningehalts einer klaren Fleischsuppe, eines Bratensaftes und einer gebundenen Ochsenschwanzsuppe..... 90
6.11.1 Bestimmung nach den Methoden SCHMID (Mikro), LÖHBERG und der neuen Methode..... 90
6.11.1.1 Klare Fleischsuppe..... 90
6.11.1.2 Bratensaft..... 91
6.11.1.3 Gebundene Ochsenschwanzsuppe..... 91
6.12 Bestimmung von 10 verschiedenen Proben nach der neuen Methode und Vergleich mit der Methode[40]..... 92
6.12.1 Extinktion und relative Standardabweichung..... 92
6.12.2 Probenbehandlung..... 93
6.12.3 Vergleich der Gesamtkreatininwerte..... 94
6.13 Geräte..... 95
7 Literaturverzeichnis..... 97

1 Einleitung

Die Gesamtkreatininbestimmung besitzt in der Lebensmittelchemie eine große Bedeutung, da Fleischextrakt, fleischhaltige und fleischextrakthaltige Lebensmittel wie Fleischbrühen, Bratensaucen, Suppen und ähnliche qualitativ nach ihrem Gehalt an Gesamtkreatinin beurteilt werden.
Unter Gesamtkreatinin versteht man hierbei die Summe des aus dem Muskelfleisch extrahierten Kreatins und dessen durch Wasserabspaltung unter Zyklisierung entstandenen Umwandlungsproduktes Kreatinin[1]. Kreatinin entsteht zu einem bestimmten Prozentsatz beim Abbau von Kreatinphosphat im Muskel in einer irreversiblen Reaktion und wird über die Nieren mit dem Urin ausgeschieden (Abb.1)[2]. An Hand des Vorkommens von Kreatin und Kreatinin im Muskelfleisch und in Fleischerzeugnissen wird der sowohl qualitative als auch quantitative Nachweis von Fleisch und fleischhaltigen Produkten geführt[3].
Der Gehalt an Gesamtkreatinin kann aber nur dann als Maß der Menge an fleisch- und fleischextrakthaltigen Ausgangsstoffen herangezogen werden, wenn Kreatin und Kreatinin ausreichend konstant im Fleisch vorkommen. Gleichzeitig dürfen Kreatin und Kreatinin, abgesehen von einem künstlichen Zusatz, in anderen Lebensmitteln nicht vorkommen. Auch darf durch die Verarbeitungsvorgänge bei der Herstellung der Lebensmittel und bei der Probenvorbereitung vor einer Gesamtkreatininbestimmung der Gesamtgehalt an Kreatin und Kreatinin nicht abnehmen. Die Arbeiten von BERGNER und KIEFER[4] zeigten, daß Kreatin und Kreatinin sowohl ausreichend konstant im Fleisch vorkommen und daß durch Erhitzen keine Verluste zu verzeichnen sind.
Der Gesamtkreatiningehalt beträgt je nach Fleischart zwischen 0,32 und 0,42%. Im Rindfleischextrakt liegt ein Gehalt von im Mittel 7,2% Gesamtkreatinin vor[3]. Die meisten der in der Lebensmittelchemie üblichen Methoden zur Gesamtkreatininbestimmung beruhen auf der Reaktion nach JAFFE[5]. Hierbei

wird Kreatinin in alkalischer Lösung mit Pikrinsäure zur Reaktion gebracht, wobei die auftretende orangerote Färbung zur Konzentrationsermittlung benutzt wird. Da mit der alkalischen Pikratlösung auch andere Stoffe, die sogenannten "Chromogene", unter Ausbildung einer störenden Färbung reagieren, war es das Bestreben vieler Autoren, durch Modifikation in der Verfahrensweise die Spezifität der JAFFE-Reaktion zu verbessern.

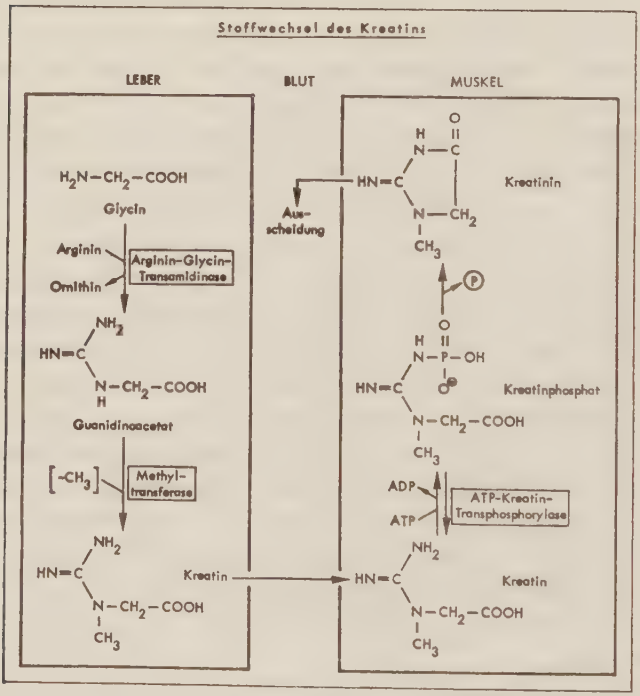


Abb.1: Stoffwechsel des Kreatins

Der Reaktionsmechanismus der JAFFE-Reaktion war schon verschiedentlich Gegenstand von Untersuchungen (vgl. 2.2). ELLINGER, SEIDEL und KOVAR[6] formulierten die Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen Kreatinin-Anion, Pikrat-Anion, MEISENHEIMER-Verbindung 2b und MEISENHEIMER-Verbindung 4 (vgl. 2.2.2) auf der Basis von UV/VIS-Untersuchungen und ^{1}H-NMR-Messungen. KOHASHI et al.[7] bestätigten durch UV/VIS- und ^{1}H-NMR-Messungen dieses Gleichgewicht.
Aufgrund des gefundenen Reaktionsmechanismus und mit Blickrichtung auf die bei der klinischen Kreatininbestimmung auftretenden Probleme gelang KOVAR und SCHMID[8] eine Optimierung der JAFFE-Reaktion und eine enzymatische Ausschaltung der störenden Chromogene (vgl. 3.1.1). Im Serum tritt jedoch ein "Kreatinfehler" auf, so daß sich diese Methode in erster Linie für die quantitative Kreatininerfassung im Urin eignet. KOVAR und LÖHBERG[9] beseitigten diesen "Kreatinfehler" im Serum durch den Einsatz weiterer Enzyme und steigerten die Empfindlichkeit des Nachweises beträchtlich (vgl. 3.1.2).
Bei der Gesamtkreatininbestimmung in Lebensmitteln über die JAFFE-Reaktion muß zuerst das vorhandene Kreatin durch eine zeitaufwendige HCl-Behandlung in Kreatinin umgewandelt werden. Ziel der Arbeit war daher, die Methoden von SCHMID und LÖHBERG auf die Bestimmung des Gesamtkreatiningehaltes von fleischextrakthaltigen Lebensmitteln zu übertragen und soweit zu modifizieren, daß die vorgeschaltete einstündige säurekatalytische Umwandlung umgangen werden konnte. Dazu sollten zuerst die umstrittenen Passagen des Reaktionsablaufes[7] mit Hilfe der ^{1}H(400 MHz)- und ^{13}C-NMR-Spektroskopie überprüft werden.

2 Entwicklung einer Arbeitshypothese

2.1 Methoden der Gesamtkreatininbestimmung

2.1.1 Enzymatische Bestimmungen

Die vornehmlich neueren enzymatischen Gesamtkreatininbestimmungsmethoden erfassen Kreatin und Kreatinin mit Hilfe einer biochemischen Reaktion. Man mißt die Extinktionsänderung im UV-Bereich.
Die Methoden beruhen auf der spezifischen, quantitativen Umwandlung von Kreatinin in Kreatin durch das Enzym Creatinin-Amidohydrolase (EC 3.5.2.-) und nachfolgender Umsetzung des Kreatins in einer biochemischen Reaktionskette. Die Auswertung geschieht über die Messung der Konzentrationsänderung eines der Reaktanden (Abb.2). Die für diese vollenzymatische Bestimmung grundlegenden Untersuchungen wurden von WAHLEFELD et al.[10,11,12] durchgeführt. Es wird die Konzentrationsabnahme des $NADH+H^+$ gemessen, die der Gesamtkreatininkonzentration direkt proportional ist[1,13].
Der Unterschied zwischen der BOEHRINGER-Methode und der auf dieser beruhenden Methode nach ETTEL und TUOR[1)] liegt lediglich in der Konzentration der NADH-Menge. ETTEL und TUOR reduzierten diese um ein Drittel und kamen so von einer anfänglichen Absorption von mehr als 1,6 Absorptionseinheiten allein für das NADH in einen für Routinemeßgeräte günstigeren Bereich.

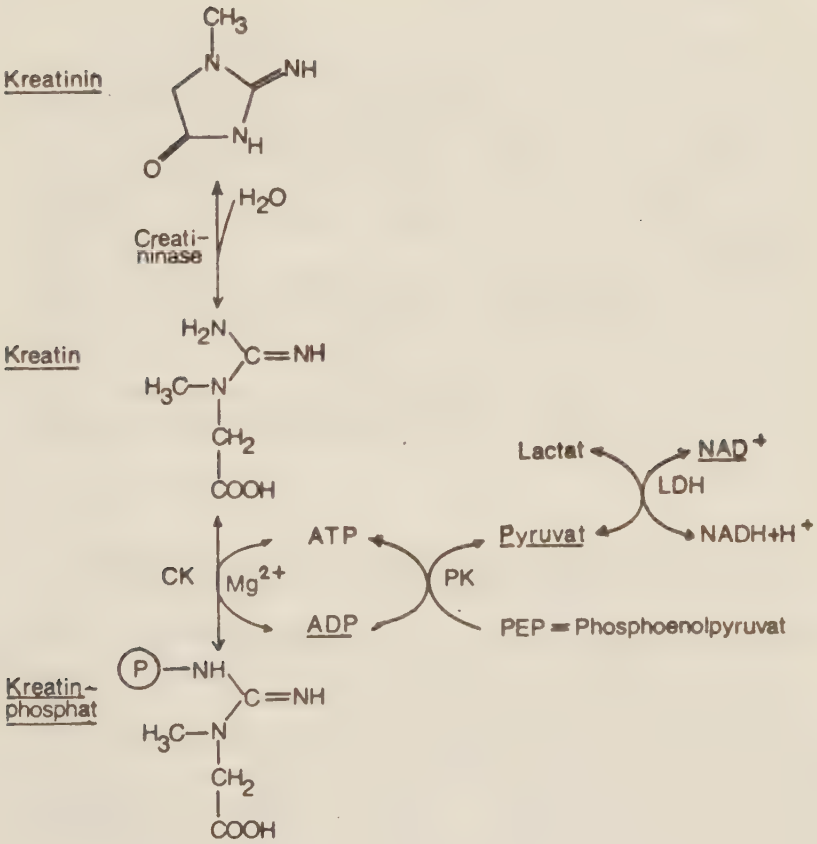


Abb.2: Prinzip der vollenzymatischen Bestimmung von Kreatinin

Creatininase	= Creatininamidohydrolase	(EC 3.5.2.-)
CK	= Creatinkinase	(EC 2.7.3.2)
PK	= Pyruvatkonase	(EC 2.7.1.40)
LDH	= Lactatdehydrogenase	(EC 1.1.1.27)

2.1.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographische und ionenaustauscherchromatographische Gesamtkreatininbestimmung

Bei diesen Methoden[14,15] erfolgt die Auftrennung des Kreatinins und der sonstigen in der Probe enthaltenen Substanzen flüssigkeitschromatographisch. CARISANO[15] setzt der Probe zu Beginn einen inneren Standard zu, um die bei der Aufarbeitung der Proben entstehenden, auf Verlusten oder Verdünnungsfehlern beruhenden Ungenauigkeiten auszuschließen.
Vor der Bestimmung wird eine Umwandlung des in der Probe enthaltenen Kreatins in Kreatinin auf säurekatalytischem Wege vollzogen. Die Detektion erfolgt mittels eines UV-Detektors, dessen Arbeitswellenlänge bei oder in der Nähe des für Kreatinin charakteristischen Absorptionsmaximums bei 234 nm liegt.

2.1.3 Auf der Reaktion nach JAFFE beruhende Methoden

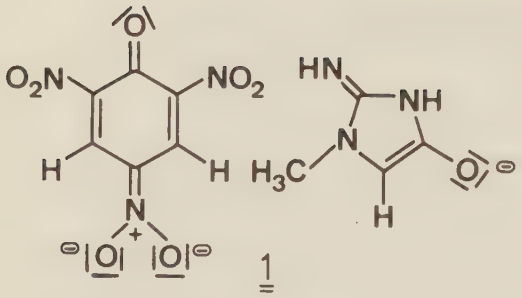
Kreatinin bildet in alkalischer Pikratlösung einen orangeroten Farbstoff aus, dessen im sichtbaren Bereich des Lichtes gelegene Extinktion gemessen wird.
Da jedoch nur das Kreatinin, das Kreatin aber nicht mit der alkalischen Pikratlösung unter Ausbildung dieses orangeroten Farbstoffes reagiert, muß zur Bestimmung des Gesamtkreatinins vor der JAFFE-Reaktion das vorhandene Kreatin in Kreatinin umgewandelt werden. Die Überführung des Kreatins in Kreatinin geschieht bei diesen Methoden durch Erhitzen und Eindampfen der wäßrigen Probelösung mit Säuren bestimmter Konzentration[16,17]. Der quantitative Verlauf der Umwandlung wird von verschiedenen Faktoren beeinflußt, wie Säuremenge und Säurekonzentration, Temperatur, Druck und Eindampfzeit. So sinkt bei zu langer Eindampfzeit oder zu hohen Säurekonzentrationen der Kreatiningehalt der Lösung wieder[4].

Unter den Bedingungen der JAFFE-Reaktion geben auch eine Reihe anderer Stoffe, sogenannte "Chromogene", wie Aceton, Acetessigsäure, Glucose, Pyruvat etc. mit den benutzten Reagenzien eine die Bestimmung störende Färbung[18]. Zur Beseitigung der Störungen durch diese Stoffe wurden von verschiedenen Autoren Verfahrensweisen ausgearbeitet, die eine Entfernung der Chromogene z.B. durch vorheriges Ausschütteln der Probelösung mit bestimmten Lösungsmitteln[16,19] wie Diethylether oder die Zerstörung der Chromogene mit Kaliumpermanganat[19,20] vor der Bestimmung nach JAFFE durchführen. Auch eine zusätzliche Filtration der Probelösung nach der Säurebehandlung wird verwandt[16,21].

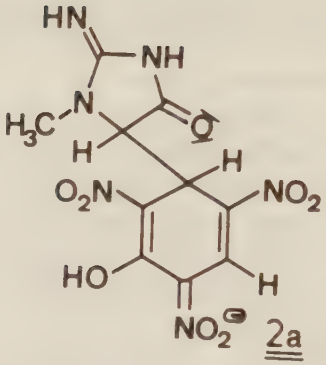
2.2 Reaktionsmechanismus der JAFFE-Reaktion

2.2.1 Vorbemerkungen

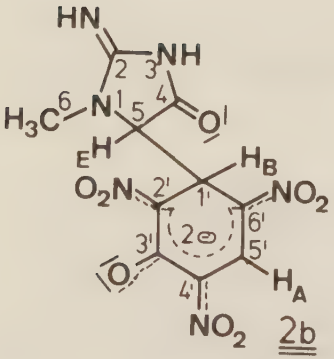
Die JAFFE-Reaktion[5] auf Kreatinin mit Pikrinsäure im alkalischen Milieu wurde von zahlreichen Autoren auf die farbgebende Komponente untersucht. Die Intensität der auftretenden orangeroten Färbung ist abhängig von der Temperatur, der Reaktionszeit und den Konzentrationen an Pikrinsäure, Natronlauge und Kreatinin. BARTELS[22] hielt die Ausbildung eines π-Komplexes aufgrund der gemessenen kinetischen Daten für wahrscheinlich. SEELIG und WÜST[23] vermuteten wegen den von ihnen gemessenen spektroskopischen Daten einen Additionskomplex 1 aus Pikrinsäure und enolisiertem Kreatinin. Im Gegensatz dazu hatte KIMURA[24] bereits 1955 einen σ-Komplex 2a für den orangeroten Farbstoff vorgeschlagen. VASILIADES[25] postulierte auf der Grundlage von ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Untersuchungen wiederum einen Additionskomplex ionischer Struktur. Auch die Bildung der ZIMMERMANN-Verbindung 3 wurde in Analogie zum Mechanismus der ZIMMERMANN-Reaktion mit m-Dinitrobenzol vermutet[26]. Die Arbeiten von ELLINGER, SEIDEL und KOVAR[6] sowie von KOHASHI et al.[7] beweisen die Bildung des Trinitrocyclohexadienat-Adduktes 2b als farbgebender Komponente der JAFFE-Reaktion.



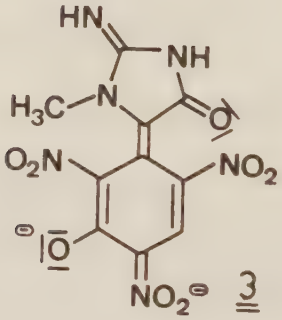
1



2a



2b



3

2.2.2 Mechanismus nach ELLINGER, SEIDEL und KOVAR

ELLINGER, SEIDEL und KOVAR[6] bestätigten mit spektroskopischen und kernresonanzbezogenen Daten die Bildung einer MEISENHEIMER-Verbindung aus einem Kreatinin-Anion und einem Pikrat-Anion. Gleichzeitig postulierten sie die Umsetzung des entstandenen Trinitrocyclohexadienat-Adduktes 2b bei höheren Laugenkonzentrationen zu einem Propenid-Addukt 4. Sie

schlossen dies aus dem Verhältnis der Maxima im Elektronenspektrum des Kreatininpikrats in 0,3N-NaOH, das nach 2 Stunden den Wert von 5 : 1 aufwies. Trinitrocyclohexadienat-Addukte zeigen normalerweise ein Verhältnis der Maxima von etwa 2 : 1. Das MEISENHEIMER Salz ändert offensichtlich im alkalischen Milieu seine Struktur.

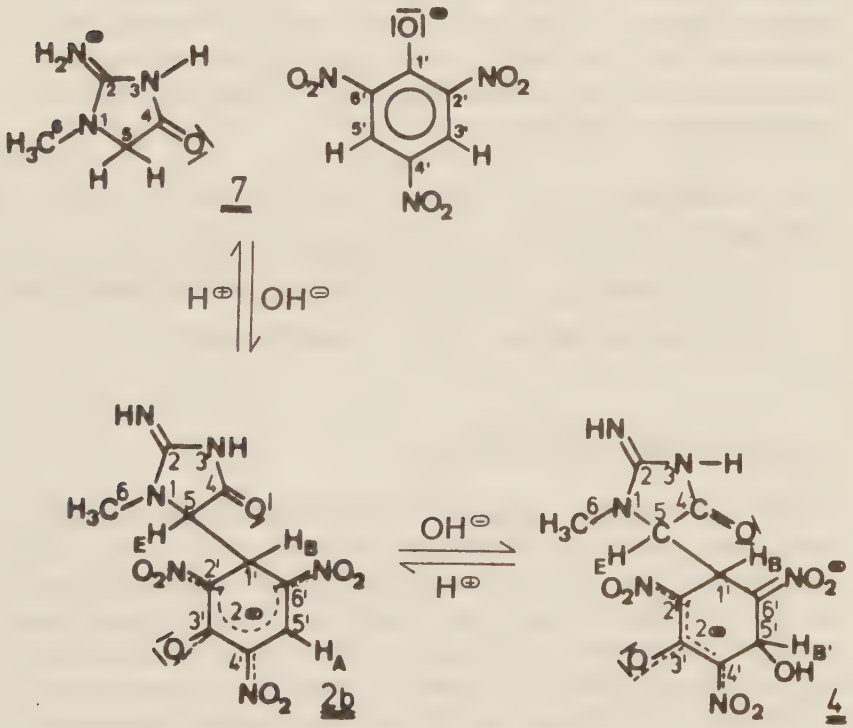


Abb.3: Reaktionsmechanismus der JAFFE-Reaktion nach ELLINGER, SEIDEL und KOVAR[6)]

Pikrinsäure addiert erst ab einer Laugenkonzentration von 2 Molen Hydroxidionen pro Liter Lösungsmittel unter der Addition von 2 Molen Hydroxid seine Struktur zum Propenid-Addukt[27]. Ein solches Propenid kann aus einer σ-Verbindung, wie aus dem MEISENHEMER Acetonylpikrat[28] schon in geringerer Laugenkonzentration innerhalb kürzester Zeit gebildet werden[29]. Das Maximum der Absorption liegt bei 395 nm. Beim Ansäuern der Reaktionslösung durch sukzessive Zugabe von 0,3N-HCl ist die Reaktion rückläufig und es tritt im Übergang die typische MEISENHEIMER Kurve des Trinitrocyclohexadienat-Adduktes auf. Weitere Säurezugabe läßt wieder das Kreatininpikrat entstehen, so daß die der JAFFE-Reaktion zugrundeliegende Gleichgewichtsreaktion folgendermaßen zu formulieren ist (vgl. Abb.3):

(1) Kreatinin + OH^- $\rightleftharpoons$ Kreatinin-Anion + H_2O

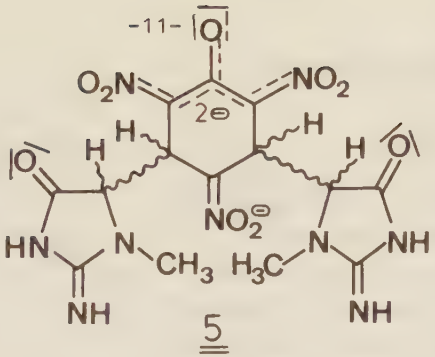
(2) Pikrinsäure + OH^- $\rightleftharpoons$ Pikrat-Anion + H_2O

(3) Pikrat-Anion + Kreatinin-Anion $\rightleftharpoons$ MEISENHEIMER-Addukt $\underline{\underline{2b}}$

(4) MEISENHEIMER-Addukt $\underline{\underline{2b}}$ + OH^- $\rightleftharpoons$ Propenid-Addukt $\underline{\underline{4}}$

2.2.3 Arbeiten von KOHASHI et al.

KOHASHI, TSURUTA und OHKURA[30] isolierten aus der alkalischen Reaktionsmischung von Pikrinsäure und Kreatinin durch Zugabe von Methanol einen "Roten Niederschlag", den sie durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Wasser zu reinigen versuchten. Hierbei veränderte sich jedoch die Farbe des Produktes von Orangerot nach Gelb. Die gelben Kristalle identifizierten sie als einen 1 : 2 σ-Komplex $\underline{\underline{5}}$ aus Pikrinsäure und Kreatinin. In einer weiteren Untersuchung[31] versuchten sie die sterische Anordnung der beiden Kreatininyl-Reste am Pikrat-Ring zu erklären. KOHASHI et al.[7] wiederholten einen Teil der beiden vorangegangenen Arbeiten[30,31], wie Elektronenabsorptionsspektren und die ^{1}H-NMR-Messung des roten Farbproduktes, das sie aus der alkalischen, Kreatinin und Pikrinsäure enthaltenden Lösung ausgefällt hatten.



5

Darüberhinaus postulierten sie die Bildung von 8 Diastereoisomeren eines 1 : 1 σ-Komplexes (Trinitrocyclohexadienat-Addukt 2b), die sich aus der räumlichen Hinderung der freien Drehbarkeit der voluminösen Kreatininmethylgruppe und der Nitrogruppen des Pikratringes ergibt. Desweiteren nahmen sie ein ^{1}H-NMR-Spektrum des "Roten Niederschlages" in 10proz. NaOD auf, dessen Interpretation mit der schon von ELLINGER, SEIDEL und KOVAR[6] formulierten Umsetzung des Trinitrocyclohexadienat-Adduktes zu einem Propenid-Addukt 4 übereinstimmt.

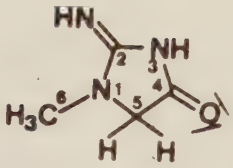
2.3 Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus

2.3.1 Vorbemerkungen

In der Arbeit von KOHASHI et al.[7] ergaben sich einige Ungereimtheiten in Bezug auf die räumliche Interpretation der Anordnung der Gruppen des Trinitrocyclohexadienat-Adduktes. Da sich nach der Synthesevorschrift[7] der "Rote Niederschlag" nicht herstellen ließ, wurde diese Verbindung nachgearbeitet und überprüft. Es wurde angestrebt, durch ^{13}C-NMR-Messungen einen weiteren Beweis für die Bildung des Trinitrocyclohexadienat-Adduktes als der farbgebenden Komponente der JAFFE-Reaktion zu erhalten und die Umsetzung zum Propenid-Salz in alkalischer Lösung nachzuweisen.

2.3.2 ^{1}H-NMR-Bestimmungen

2.3.2.1 Kreatinin



6

Kreatinin (Abb.4) zeigt in D_2O erwartungsgemäß neben dem Lösungsmittelpeak bei 4.67 ppm zwei Peaks. Aufgrund der Integrale und der erwarteten chemischen Verschiebungen lassen sich die Protonen der Methylgruppe an N-1 dem Signal bei 2.98 ppm und die Wasserstoffe der Methylengruppe dem Signal bei 3.98 ppm zuordnen. Die Protonen der tautomeren Aminogruppe am Kohlenstoffatom C-2 sind wegen des rasch erfolgenden Austausches in D_2O gegen Deuterium nicht zu erkennen. Die Methylgruppe an N-1 ist mit 0,6 Hz angespalten. Wie die Selektiventkopplung (Abb.5) zeigt, muß dies auf eine Kopplung mit einem der beiden Protonen an C-5 zurückgeführt werden (Long-Range-Kopplung).

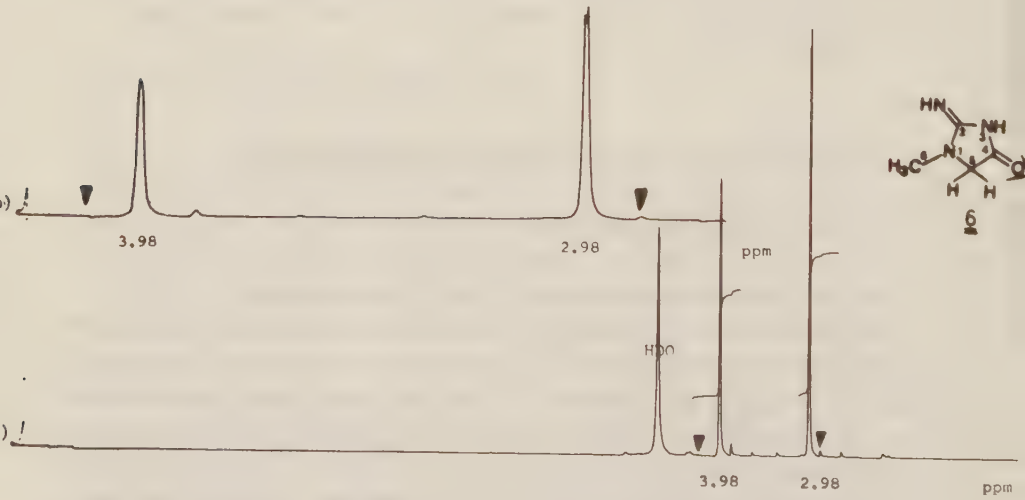
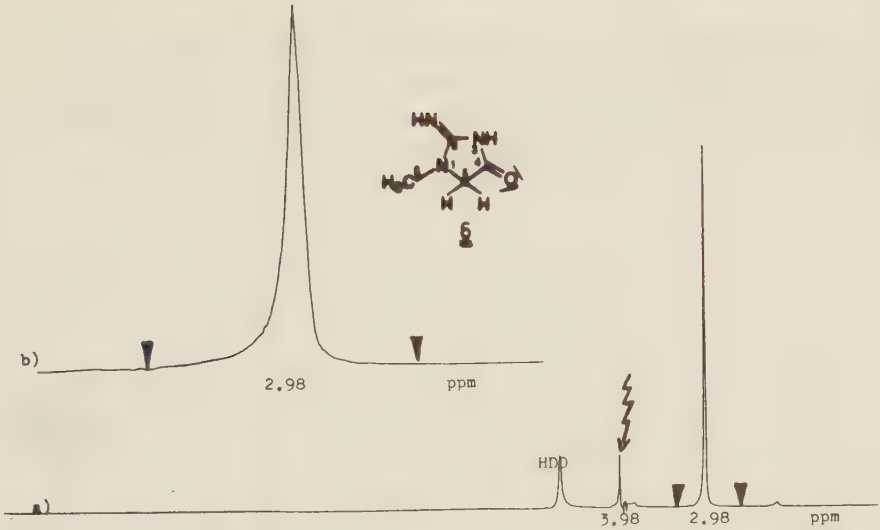


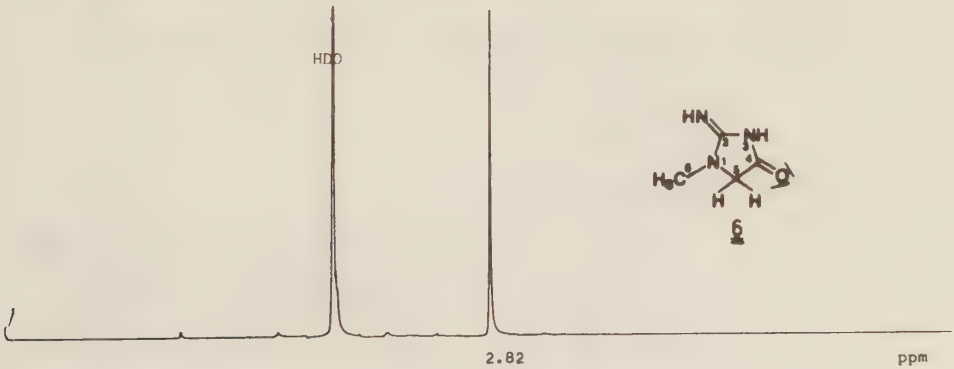
Abb.4: a) 80 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum von Kreatinin (6) in D_2O
b) gespreizter Teilbereich



§

Abb.5: a) 80 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum von Kreatinin in D_2O
Selektiventkopplung bei 3.98 ppm
b) Signal der Methylprotonen bei 2.98 ppm gespreizt

Mißt man Kreatinin in einer 1N-NaOD (Abb.6), so verschwindet das Signal für die Wasserstoffe an C-5 erwartungsgemäß, da durch die Nachbarschaft der Methylengruppe zur Carbonylgruppe die Protonen acid sind und leicht gegen Deuterium ausgetauscht werden.



§

Abb.6: 80 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum von Kreatinin in 1N-NaOD

In DMSO-d_6 sind alle wasserstofftragenden Gruppen des Kreatinins erkennbar. Die Methylgruppe an N-1 erscheint bei 2.90 ppm, die Methylengruppe bei 3.66 ppm und die Protonen der Guanidinofunktion bei 7.41 ppm (Abb.7).

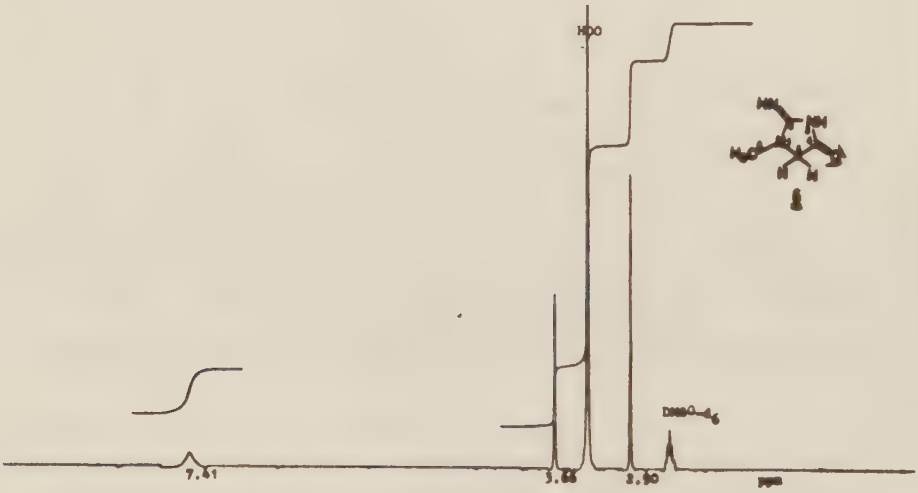
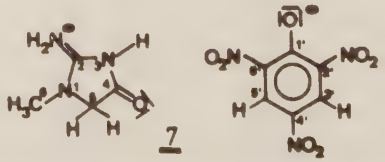


Abb.7: 80 MHz-^{1}H-NMR-Spekturm von Kreatinin (6) in DMSO-d_6

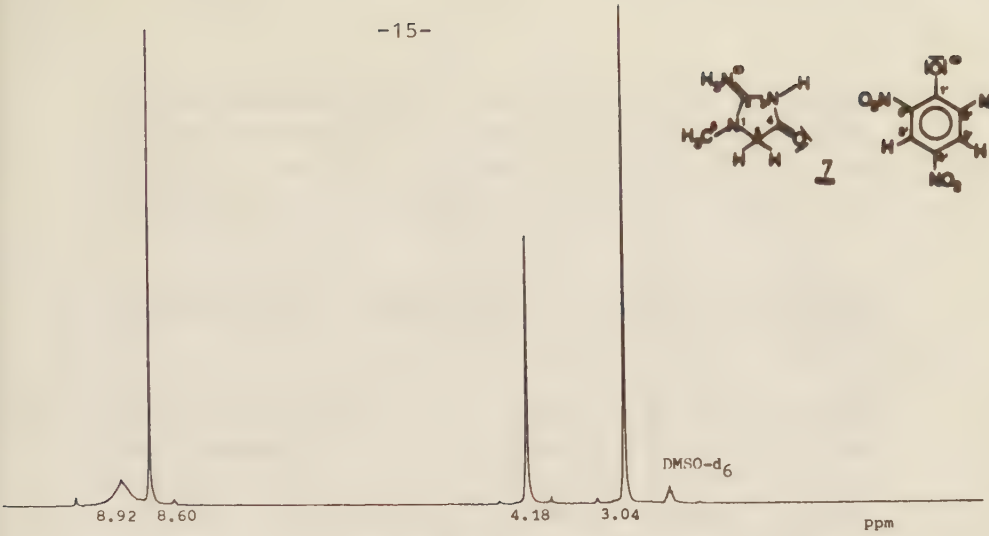
Die in D_2O beobachtete Anspaltung der Methylgruppe an N-1 tritt hier nicht in Erscheinung.

2.3.2.2 Kreatininpikrat



7

Da sich Kreatininpikrat (7) in Wasser schlecht löst und dabei Pikrinsäure ausfällt, wurde als Lösungsmittel Dimethylsulfoxid genommen (Abb.8).



7

Abb.8: 80 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum von Kreatininpikrat (7) in DMSO-d_6

Die Ergebnisse der Messung und die Zuordnung der Signale von Kreatinin in DMSO-d_6, Kreatininpikrat in DMSO-d_6 und von Kreatininpikrat in DMSO-d_6 mit einem Zusatz von D_2O sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab.1: Zuordnung der ^{1}H-Resonanzen von Kreatinin (6) und Kreatininpikrat (7)

	Kreatinin in DMSO-d_6		Kreatininpikrat in DMSO-d_6		Kreatininpikrat in DMSO-d_6/D_2O	
	ppm	Integral	ppm	Integral	ppm	Integral
$=NH_2^+$ $-NH$	7.41	breites Signal	8.92	breites Signal	- Austausch gg. D	-
aromat. H	-	-	8.60	2 H	8.57	1 H
$-CH_2$	3.66	2 H	4.18	2 H	4.14	2 H
$-CH_3$	2.90	3 H	3.04	3 H	2.99	3 H

Der Zusatz von D_2O zu der Lösung von Kreatininpikrat in DMSO-d_6 ergab interessanterweise eine Verminderung des Integrals der aromatischen Pikratprotonen von 2 H auf 1 H. Offensichtlich erfolgte ein Austausch gegen Deuterium.

2.3.2.3 Trinitrocyclohexadienat-Addukt aus Pikrinsäure und Kreatinin

Die "Rote Substanz" 2b, die aus Kreatinin und Pikrinsäure in methanolischer Natronlauge erhalten wird, zersetzt sich in Wasser rasch (vgl. UV/VIS-Spektrum der "Roten Substanz"). KOHASHI, TSURUTA und OHKURA[30] und KOHASHI et al[7] konnten ihren "Roten Niederschlag" nur in D_2O lösen, da nach ihren Untersuchungen dies das einzige Lösungsmittel war, in dem sich die Substanz löste. Dagegen hatten schon FABINY und ERTINGHAUSEN[32] von dem nach SEELIG[33] hergestellten "Roten Niederschlag" ein ^{1}H-NMR-Spektrum in DMSO-d_6 aufgenommen. Bei Lösungsversuchen zeigte sich eine Löslichkeit des aus der methanolischen Natronlauge ausgefällten "Roten Produktes" in DMSO und in Methanol. Da in Methanol mit der Zeit auch eine, im Vergleich mit einer wäßrigen Lösung zwar wesentlich geringere Zersetzung eintrat, war für die ^{1}H-NMR und auch für die folgenden ^{13}C-NMR-Messungen Dimethylsulfoxid das Lösungsmittel der Wahl.

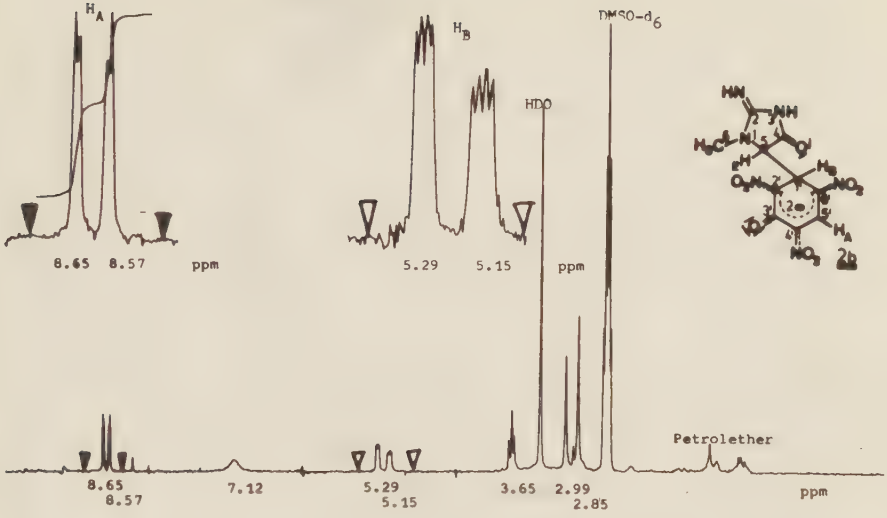


Abb.9: 80 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum der "Roten Substanz" 2b in DMSO-d_6 mit Spreizung von H_A und H_B

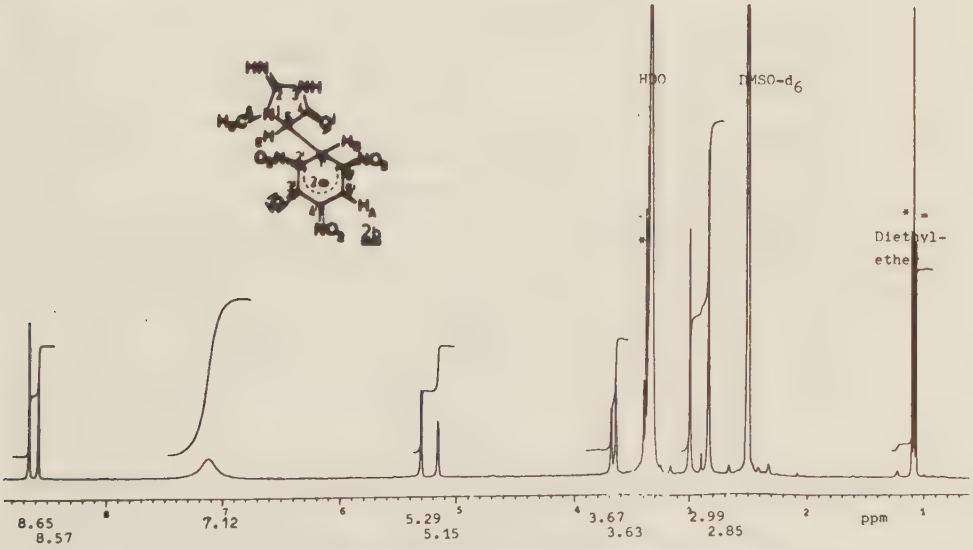


Abb.10a: 400 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum der "Roten Substanz" 2b in DMSO-d_6

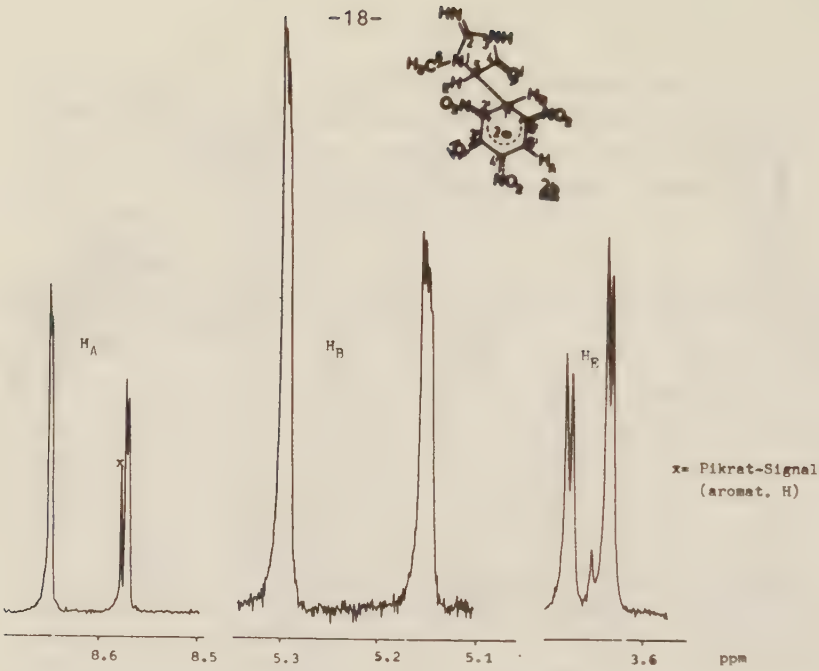
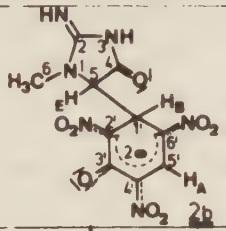


Abb.10b: 400 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum der "Roten Substanz" 2b in DMSO-d_6, gespreizter Spektrenteil

Beim Vergleich der Spektren der Ausgangsverbindungen (Abb.7 und 8) mit den Spektren der isolierten "Roten Substanz" (Abb.9, 10 und Tab.2) fällt zunächst die Verdopplung der Signale auf, welche auf Rotamere oder Diastereomere zurückzuführen ist und weiter unten erörtert wird (2.3.2.5).
Die tautomere Aminofunktion ist wegen der erfolgten Protonierung beim Kreatininpikrat gegenüber Kreatinin um 1.51 ppm von 7.41 nach 8.92 ppm tieffeldverschoben. Die Bildung der MEISENHEIMER-Verbindung 2b im alkalischen Milieu hebt diese Protonierung wieder auf und führt gleichzeitig zu einer geringen Hochfeldverschiebung im Vergleich mit Kreatinin um 0.29 ppm nach 7.12 ppm.
Die Methylgruppe an N-1 des Kreatininylrestes der MEISENHEIMER-Verbindung zeigt zwei Signale bei 2.99 und 2.85 ppm. Im Vergleich mit Kreatininpikrat sind beide Signale hochfeldverschoben; gegenüber Kreatinin (2.90 ppm) ist das eine Signal um 0.05 ppm abgeschirmt und das andere um 0.09 ppm entschirmt.

Ähnlich liegen die Verhältnisse bei den Methingruppen des Trinitrocyclohexadienat-Adduktes (3.67 und 3.63 ppm), des Kreatininpikrates (4.18 ppm) und des Kreatinins (3.66 ppm). In 2b ist die ursprüngliche Äquivalenz der aromatischen Protonen des Pikratringes (8.60 ppm) aufgehoben. Man erhält zwei Signalgruppen bei 8.65 und 8.57 ppm und bei 5.29 und 5.15 ppm. Die starke Hochfeldverschiebung von H_B (5.29 und 5.15 ppm) wird durch die Addition eines Kreatininylrestes in Position 3' des Pikratringes verursacht, wodurch sich der Hybridisierungszustand des entsprechenden Kohlenstoffes von sp^2 nach sp^3 verändert.

Tab.2: Zuordnung der ^{1}H-Resonanzen [ppm] mit Kopplungskonstanten [Hz] des Trinitrocyclohexadienats 2b in DMSO-d_6



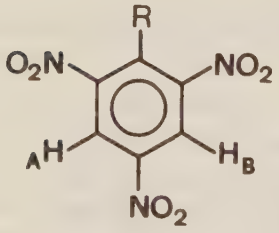
2b

[ppm]	Integral	Signal	Kopplung [Hz]	Zuordnung
8.65	1 H	d	$^4J_{H_AH_B}$ = 0,81	H_A
8.57	1 H	d	$^4J_{H_A^{\blacktriangle}H_B^{\blacktriangle}}$ = 1,11	$H_A^{\blacktriangle}$
8.58	-	s	-	Pikrat
7.12	schlecht meßbar	breites Signal	-	=NH, -NH
5.29	1 H	dd	$^4J_{H_AH_B}$ = 0,81 $^3J_{H_BH_E}$ = 2,11	H_B
5.15	1 H	dd	$^4J_{H_A^{\blacktriangle}H_B^{\blacktriangle}}$ = 1,11 $^3J_{H_B^{\blacktriangle}H_E^{\blacktriangle}}$ = 2,56	$H_B^{\blacktriangle}$
3.67	1 H	d	$^3J_{H_E^{\blacktriangle}H_B^{\blacktriangle}}$ = 2,56	$H_E^{\blacktriangle}$
3.63	1 H	d	$^3J_{H_EH_B}$ = 2,11	H_E
2.99	3 H	s	-	$-CH_3^{\blacktriangle}$
2.85	3 H	s	-	$-CH_3$

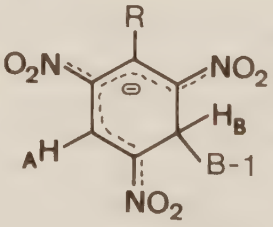
▲= Signale der diastereomeren Verbindung

2.3.2.4 Propenid-Addukt

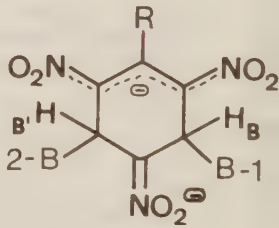
Nimmt man von der "Roten Substanz" in 1N-NaOD ein 400 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum auf (Abb.11a, 11b und Tab.3), so zeigen sich im Vergleich mit dem Spektrum des Trinitrocyclohexadienat-Adduktes (Abb.10a und 10b) Unterschiede in der chemischen Verschiebung der einzelnen Gruppen, die auf eine erfolgte Umsetzung der "Roten Substanz" in dem stark alkalischen Milieu hinweisen. Die beiden Signale bei 8.65 und 8.57 ppm des "quasiaromatischen" Pikratprotons H_A bzw. H_A▲ sind verschwunden. Dafür tauchen bei 6.19 und 6.06 ppm zwei neue Signale auf, die als H_B, und H_B,▲ bezeichnet werden. Signale für H_E bzw. H_E▲ sind nicht zu erkennen. Diese Beobachtung macht man auch bei der Messung von Kreatinin in NaOD, da wegen der Acidität der Protonen am C-5 ein Austausch gegen Deuterium erfolgt (2.3.2.1).
Die Hochfeldverschiebung des H_A bzw. H_A▲ -Protons steht in Übereinkunft mit den vergleichenden Untersuchungen an MEISENHEIMER-Verbindungen der Strukturen 9 und 10[34].



8



9

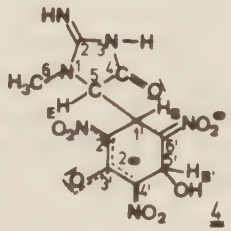


10

Bildet sich aus einem Trinitroderivat der Struktur 8 mit der Base B-1 ein Trinitrocyclohexadienat-Addukt der Formel 9, so erhält man für die vormals äquivalenten, aromatischen Protonen H_A und H_B zwei verschiedene Signale. Durch die Anlagerung der Base B-1 wird das H_B-Proton von 8.9 - 8.2 ppm nach 6.4 - 5.0 ppm zu höherem Feld hin verschoben.

Das H_A-Proton ändert seine chemische Verschiebung nur geringfügig zu höherem Feld. Bei Addition einer weiteren Base B-2 wird auch das zweite "quasiaromatische" Proton (H_A) deutlich hochfeldverschoben ($\delta \simeq 6$ ppm). Es wird hier als $H_{B'}$ bezeichnet.

Tab.3: Zuordnung der ^{1}H-Resonanzen [ppm] des Propenid-Adduktes 4 in 1N-NaOD



4

[ppm]	Integral	Signal	Kopplung [Hz]	Zuordnung
6.19	1 H	s	-	$H_{B'}$
6.06	1 H	d	$^4J_{H_{B'}\blacktriangle H_B\blacktriangle} = 0,6$	$H_{B'}\blacktriangle$
5.15	1 H	d	$^4J_{H_B\blacktriangle H_{B'}\blacktriangle} = 0,6$	$H_B\blacktriangle$
5.08	1 H	s	-	H_B
2.92	3 H	s	-	$N\text{-}CH_3\blacktriangle$
2.50	3 H	s	-	$N\text{-}CH_3$

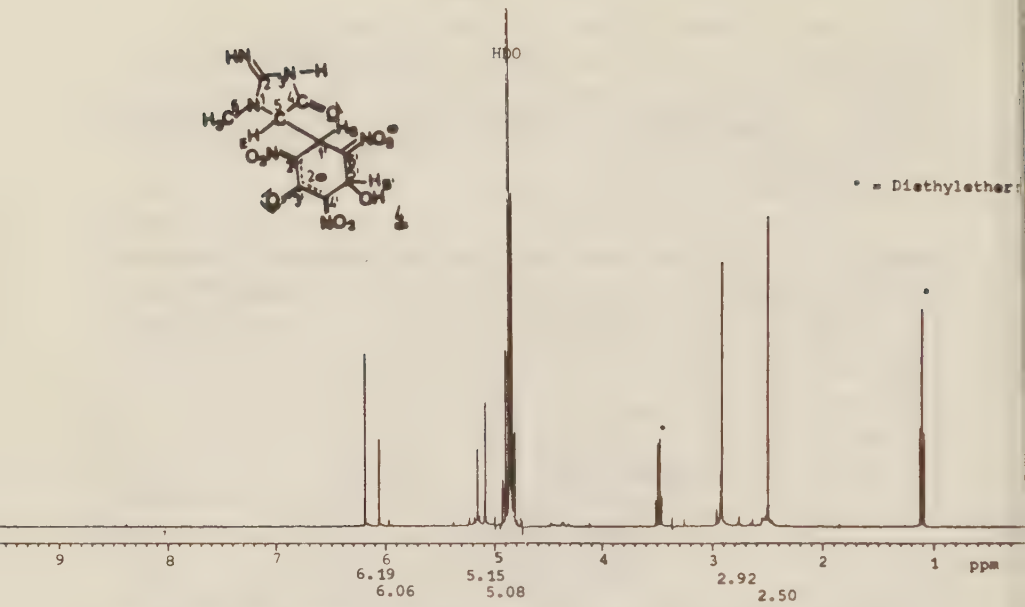


Abb.11a: 400 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum des Propenid-Adduktes 4 in 1N-NaOD gemessen

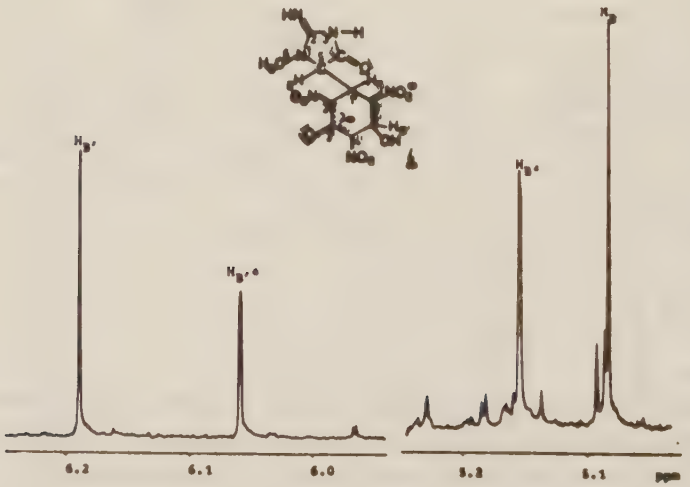


Abb.11b: 400 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum des Propenid-Adduktes 4 in 1N-NaOD, gespreizter Spektrumteil

In der vorliegenden Verbindung 4 werden beide Protonen abgeschirmt und erscheinen nunmehr bei $\delta < 6.2$ ppm. Sie beweisen das Vorliegen eines Propenid-Salzes. Bei den geringen Konzentrationen von 2b in der 1N-NaOD der 400 MHz-^{1}H-NMR-Messung erfolgt die Umsetzung zu 4 vollständig und ohne erkennbare Zersetzung.

2.3.2.5 Diskussion der Signalverdopplung

Im Gegensatz zu FABINY und ERTINGSHAUSEN[32] wurden in Übereinstimmung mit KOHASHI et al.[7] sowohl bei der Trinitrocyclohexadienat- 2b als auch bei der Propenid-Verbindung 4 Signalverdopplungen festgestellt. Hierbei zeigte sich eine weitgehende Übereinstimmung mit der Messung der japanischen Autoren. Bei der Interpretation der Signale ergaben sich jedoch bedingt durch die größere Trennschärfe der 400 MHz-^{1}H-NMR-Spektren kleinere Korrekturen, die im Hinblick auf die Interpretation der Signalverdopplungen von Bedeutung sind. Die H_A, H_B, H_E und N-CH_3 genannten Protonen der Formel 2b entsprechen denen nach KOHASHI et al. als H_a, H_b, H_c und CH_3 bezeichneten. Diese bilden ein sogenanntes AMX-System. Nach der japanischen Arbeit stellt das Signal bei 8.85 ppm ein Singulett, das bei 5.38 ppm ein Dublett mit der Kopplung von 2,0 Hz dar. In der Abbildung 12a (2b in D_2O) liegen diese Signale bei 8.90 und 5.43 ppm. Wie aus dem gespreizten Spektrum der Abbildung 10b ersichtlich ist, spaltet dieses Signal für das H_A-Proton in ein Dublett der Kopplungskonstanten $J_{H_AH_B}$ = 0,81 Hz und das H_B-Signal in ein Dublett von Dubletts mit der Kopplung von $J_{H_BH_E}$ = 2,11 Hz und $J_{H_BH_A}$ = 0,81 Hz.
Beim Vergleich der anderen H_A und H_B-Signalgruppen ergeben sich nur geringfügige Unterschiede in den Kopplungskonstanten von 1,0 und 2,0 Hz[7] zu den gemessenen $J_{H_A^{\blacktriangle} H_B^{\blacktriangle}}$ = 1,11 und $J_{H_B^{\blacktriangle} H_E^{\blacktriangle}}$ = 2,56 Hz.
Man findet somit verschiedene allylische Kopplungskonstanten zwischen H_A und H_B bzw. $H_A^{\blacktriangle}$ und $H_B^{\blacktriangle}$.

KOHASHI et al.[7] erklären die Signalverdopplung mit der Bildung rotamerer Formen von "8(?) Diastereomeren". Tatsächlich können aber bei den beiden chiralen C-Atomen (C-5 und C-1') der MEISENHEIMER-Verbindung 2b nur 2 Diastereomerenpaare mit unterschiedlicher Konformation (Rotamere) vorliegen (Abb.13 und 14).

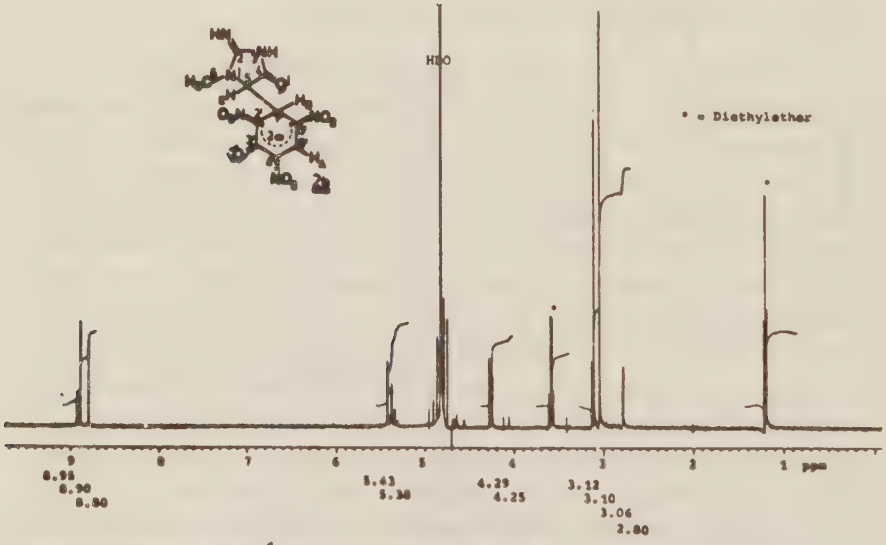


Abb.12a: 400 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum der "roten Substanz" 2b, sofort nach dem Lösen in D_2O gemessen

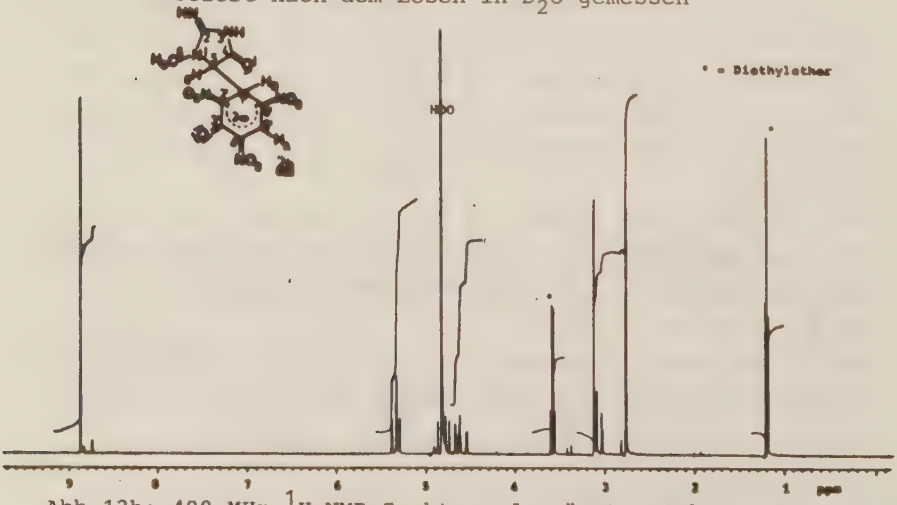


Abb.12b: 400 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum der "roten Substanz" 2b, 2 Tage nach dem Lösen in D_2O gemessen

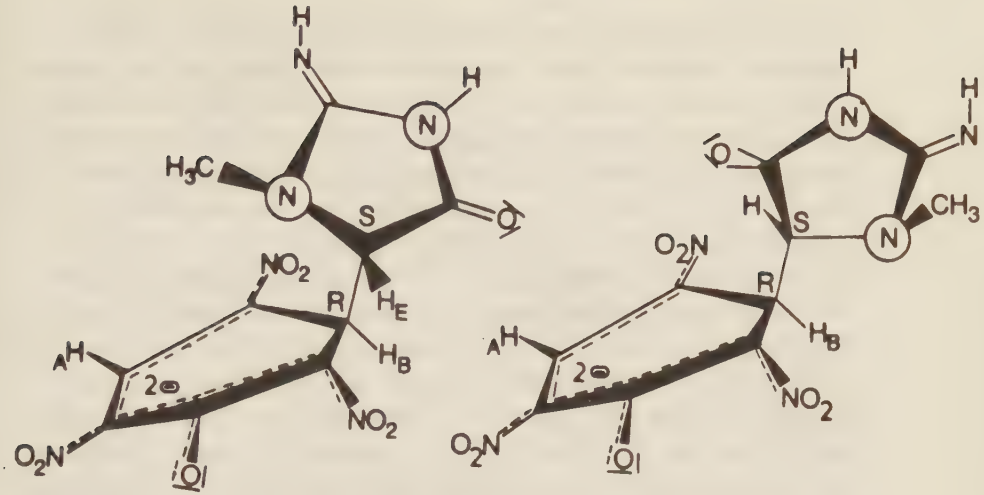


Abb.13: Rotamerenpaar des Trinitrocyclohexadienat-Addukts 2b, absolute Konfiguration 5S,1'R.

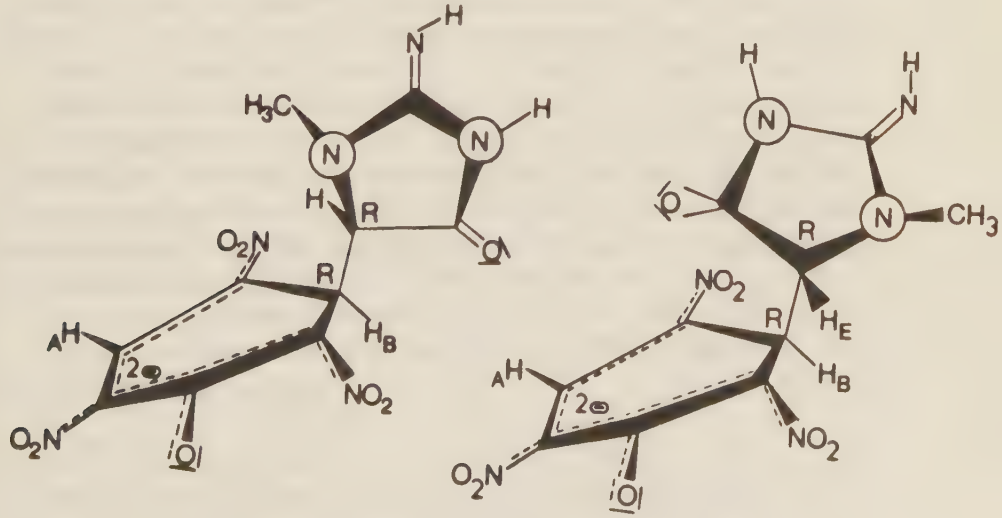


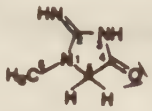
Abb.14: Rotamerenpaar des Diastereomers von Abbildung 13, absolute Konfiguration 5R,1'R.

Für jede Form würde man unterschiedliche Protonensignale erwarten. KOHASHI führt die Signalverdopplung auf Rotationsisomere zurück. Bei freier, schneller Rotation um die Bindung zwischen C-5 und C-1' müßte man eine vicinale Kopplungskonstante von ungefähr 7 Hz erhalten. Da die Kopplungen aber nur 2,11 und 2,56 Hz betragen, die nach der Karplus-Conroy-Kurve[35] Torsionswinkeln von 60-70°/107-117° bzw. 55-65°/110-120° entsprechen, ist die freie Rotation zumindest behindert. Andererseits spricht die geringe chemische Verschiebungsdifferenz der N-Methylprotonen von 0,04 ppm in D_2O bzw. 0,14 ppm in DMSO-d_6 nicht für das Vorliegen von Rotationsisomeren, sondern die unterschiedlichen allylischen Kopplungen von 0,81 und 1,11 Hz zwischen H_A und H_B beweisen in Verbindung mit Hochtemperaturmessungen das Vorhandensein von Diastereomeren (siehe auch 2.3.3.4).
Da nicht mehr als 2 Signale für jedes Proton festzustellen sind, dürfte wegen der Kopplungsbeträge von H_B mit H_E eine bestimmte räumliche Anordnung bevorzugt sein.
Im Propenid-Salz 4 erleidet eine der beiden N-Methylgruppen eine deutliche Hochfeldverschiebung um 0.42 ppm nach 2.50 ppm. Die Lokalisierung eines Teils der negativen Ladung an der Nitrogruppe C-6' verstärkt dabei den positiven Anisotropieeffekt nur im Falle des (5R,S/ 1'R,S) -Enantiomerenpaares auf die Protonen der N-Methylgruppe. Im Gegensatz zu KOHASHI sind die Signale bei 6.06 und 5.15 ppm des Propenid-Adduktes 4 keine Singuletts, sondern Dubletts mit der Kopplungskonstanten $J_{H_B' \blacktriangle H_B \blacktriangle}$ = 0,6 Hz. Da keine weiteren Signalverdopplungen festzustellen sind, kann man davon ausgehen, daß die Addition von Hydroxid an C-5' aus räumlichen Gründen stereoselektiv verläuft.

2.3.3 ^{13}C-NMR-Bestimmungen

2.3.3.1 Kreatinin

Löst man Kreatinin (6) in 5N-NaOD, so zeigen sich für die 4 Kohlenstoffatome des Moleküls nur drei Signale (Abb.15).



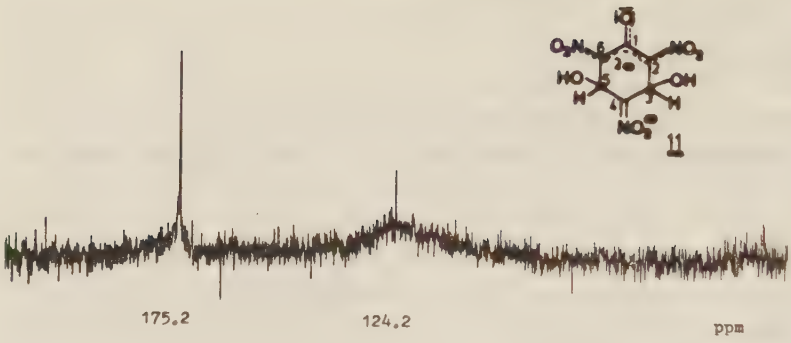
6

Abb.15: 20,115-MHz-^{13}C-$\{^{1}H\}$-NMR-Spektrum von Kreatinin (6), in 5N-NaOD gelöst, breitbandentkoppelt

Die Signale bei 181.3, 165.3 und 39.9 ppm sind den Kohlenstoffen C-4, C-2 und C-6 zuzuordnen. Der Kohlenstoff C-5 erscheint im Spektrum nicht, da durch die Acidität der Methylenprotonen ein Austausch gegen Deuterium erfolgt und das Signal bei den gegebenen Meßbedingungen im Rauschen des Spektrums verschwindet.

2.3.3.2 Pikrinsäure

Im ^{13}C-NMR-Spektrum der Pikrinsäure in 5N-NaOD werden unter den gewählten Meßbedingungen für 6 Kohlenstoffe nur zwei deutlich erkennbare Signale bei 175.2 und 124.2 ppm registriert (Abb.16). Hierbei erfolgt eine Umsetzung zum Propenid-Salz 11[27].

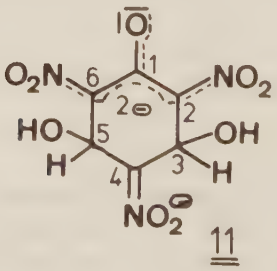


11

Abb.16: 20,115 MHz-^{13}C-$\{^1H\}$-NMR-Spektrum von Pikrinsäure in 5N-NaOD gemessen, breitbandentkoppelt

Das starke Signal bei 175.2 ppm gehört dem Phenolat-Kohlenstoff in Stellung 1 des Propenid-Salzes 11, der im Spektrum der Pikrinsäure bei wesentlich höherem Feld erscheint[36,25].

Das schwache Signal bei 124.2 ppm läßt sich nicht eindeutig einem Kohlenstoff der Verbindung 11 zuordnen. In Frage kommen die Kohlenstoffe 2 und 6 bzw. 4, da die beiden Kohlenstoffatome C-3 und C-5 wegen der von sp^2 nach sp^3 veränderten Hybridisierung und der vorhandenen Substituenten bei $\delta \simeq 60$ ppm zu erwarten sind.



11

2.3.3.3 Kreatininpikrat

Kreatininpikrat (7) wurde in DMSO-d_6 gelöst und gemessen (Abb.17). Es ließen sich die Kohlenstoffatome eindeutig zuordnen (Tab.4).

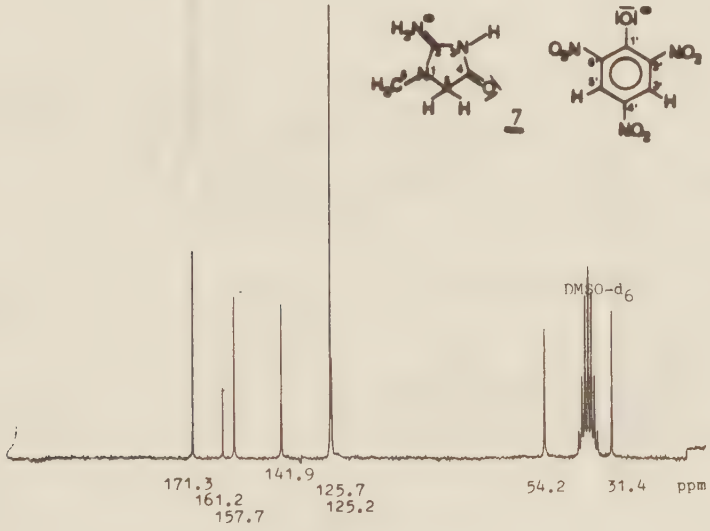


Abb.17a: 20,115 MHz-^{13}C-$\{^1H\}$-NMR-Spektrum von 7, breitbandentkoppelt

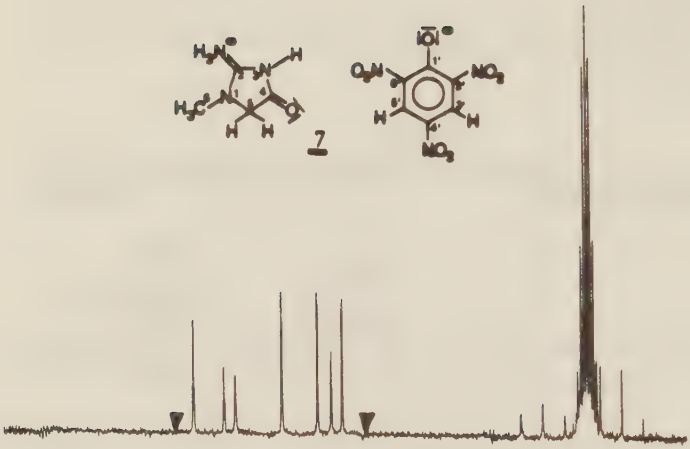


Abb.17b: Alternierend gepulstes Spektrum

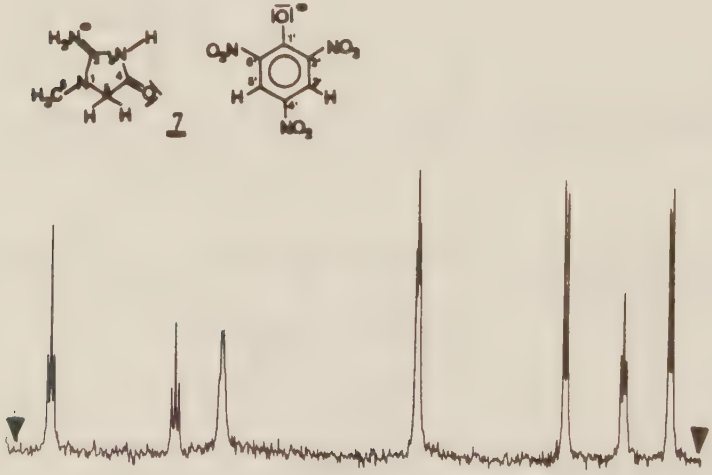
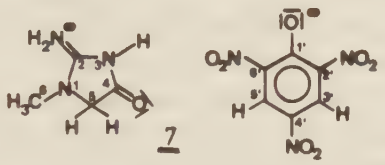


Abb.17c: Alternierend gepulstes Spektrum, gespreizter Spektrumteil

Tab.4: Zuordnung der ^{13}C-Resonanzen von Kreatininpikrat (7) mit Kopplungspartnern und Kopplungskonstanten in DMSO-d_6



7

ppm	Multiplizität	Kopplung [Hz]	Zuordnung
171.3	S_t	$^2J_{C-4/H-5}$ = 10	C-4
161.2	S_t	$^3J_{C-1'/H-3',5'}$ = 12	C-1'
157.7	S_m	nicht aufgelöst	C-2
141.9	S_t	$^2J_{C-2',C-6'/H_2-3',5'}$ = 9	C-2',6'
125.7	D_d	$^1J_{C-3'/H-3'}$ = $^1J_{C-5'/H-5'}$ = 165 ; $^3J_{C-3'/H-5'}$ = $^3J_{C-5'/H-3'}$ = 6,5	C-3',5'
125.2	S_t	$^2J_{C-4'/H-3,',5'}$ = 9	C-4'
54.2	T	$^1J_{C-5/H-5}$ = 148	C-5
31.4	Q	$^1J_{C-6/H-6}$ = 138	C-6

Die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffe des Kreatininpikrates in DMSO-d_6, des Kreatinin-HCl-Salzes in D_2O nach DIETRICH, MARLETTA und KENYON[37] und des Kreatinins in D_2O sowie von Pikrinsäure in DMSO-d_6 nach VASILIADES[25] ist der Tabelle 5 zu entnehmen.
Die starke Hochfeldverschiebung der C-2 und C-4 Kohlenstoffe des Kreatininpikrates gegenüber Kreatinin läßt sich durch die Protonierung der Guanidinogruppe erklären[38]. Im Kreatininpikrat bildet der C-4 Kohlenstoff ein Ferntriplett mit den beiden benachbarten Protonen an C-5. Eine Fernkopplung mit dem Proton an N-3 ist nicht erkennbar, wie von Carbonsäureamiden her bekannt ist. C-2 stellt ein Singulett von Fernmultiplett dar, das nicht aufgelöst ist, wogegen C-2',6' und C-4' gut aufgelöst als Singulett von Ferntriplett erscheinen.

Tab.5: Vergleich der chemischen Verschiebung [ppm] von 7, Kreatinin-HCl, 6 und Pikrinsäure

Kreatininpikrat in DMSO-d_6 7	Kreatinin-HCl in D_2O[37]	Kreatinin in D_2O[25] 6	Pikrinsäure in DMSO-d_6[25]	Kohlenstoff-Nummer
171.3	173.3	190.0	--	C-4
161.2	--	--	160.0	C-1'
157.7	157.8	170.5	--	C-2
141.9	--	--	142.6	C-2',6'
125.7	--	--	126.6	C-3',5'
125.2	--	--	128.8	C-4'
54.2	55.1	57.4	--	C-5
31.4	32.1	31.3	--	C-6

C-3' und C-5' zeigen aufgrund ihrer chemischen Äquivalenz, wie C-2' und C-6' gleiche Verschiebung und bilden ein Dublett von Ferndublett mit der direkten Kopplung von J = 165 Hz. Für den Vergleich mit dem Trinitrocyclohexadienat-Addukt 2b ist der C-5 Kohlenstoff wichtig. Im gekoppelten Spektrum ergibt sich durch Direktkopplung mit den beiden gebundenen Protonen ein Triplett mit der Kopplung von J = 148 Hz. Bei der Bildung der MEISENHEIMER Verbindung muß unter Abspaltung eines Protons aus diesem Triplett ein Dublett entstehen. Der C-6 bildet ein Quartett mit der Kopplungskonstanten von 138 Hz.
Bei der Umsetzung von 7 zu 2b wird die chemische Äquivalenz sowohl von C-2',6' als auch von C-3',5' aufgehoben. Bei der Anlagerung des Kreatininyl-Restes an den Pikratring in 3' oder 5'-Position bildet sich ein neues Signal im Aliphatenbereich des Spektrums aus.

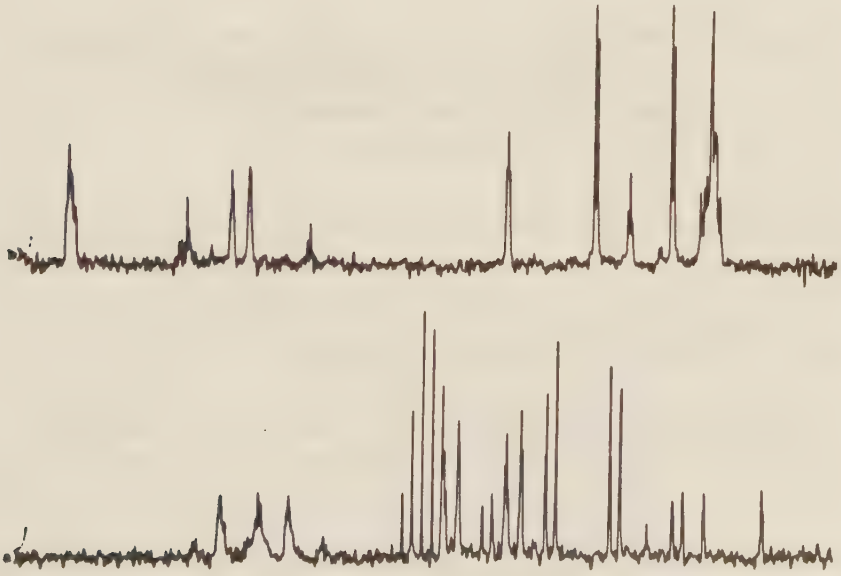


Abb.18a: Alternierend gepulstes Doppelresonanzspektrum 20,115-MHz-^{13}C-NMR-Spektrum des Trinitrocyclohexadienats 2b in D_2O

a) gespreizter Aliphatenbereich
b) gespreizter Aromatenbereich

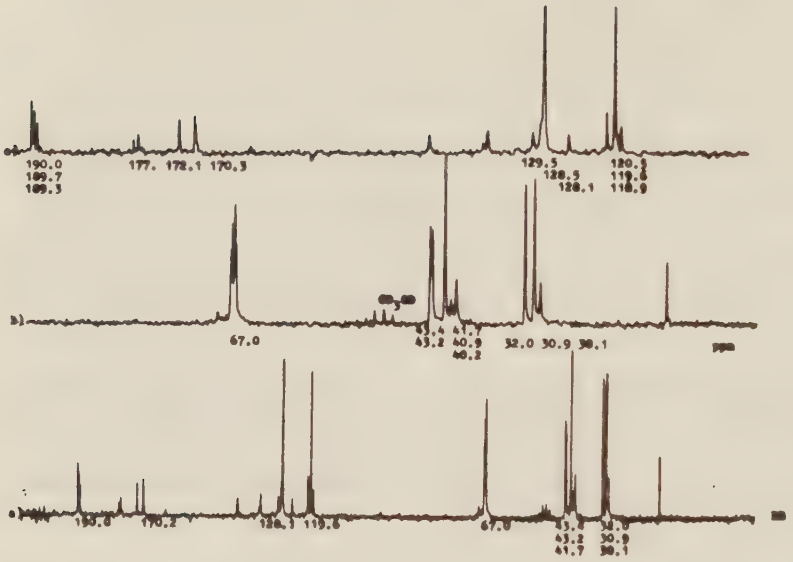


Abb.18b: a) Breitbandentkoppeltes 20,115 MHz-^{13}C-$\{^1H\}$-NMR des Trinitrocyclohexadienats 2b in D_2O
b) gespreizter Aliphatenbereich
c) gespreizter Aromatenbereich

2.3.3.4 Trinitrocyclohexadienat-Addukt

Da sich bei der Messung 2b in D_2O (Abb.18) 2b zersetzte, wurde in DMSO-d_6 die Messung wiederholt (Abb.19 und 20).

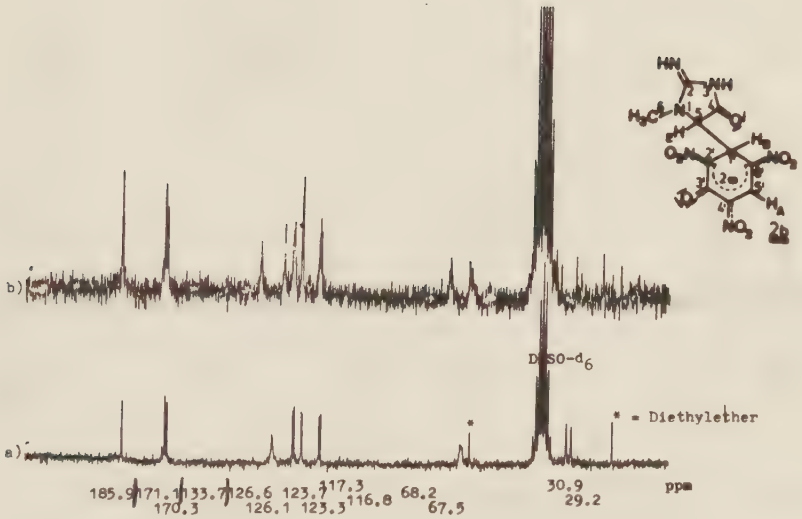


Abb.19: 20,115 MHz-^{13}C-NMR-Spektren des Trinitrocyclohexadienat-Adduktes 2b in DMSO-d_6

a) ^{13}C-$\{^1H\}$-breitbandentkoppelt

b) alternierend gepulstes Doppelresonanzspektrum

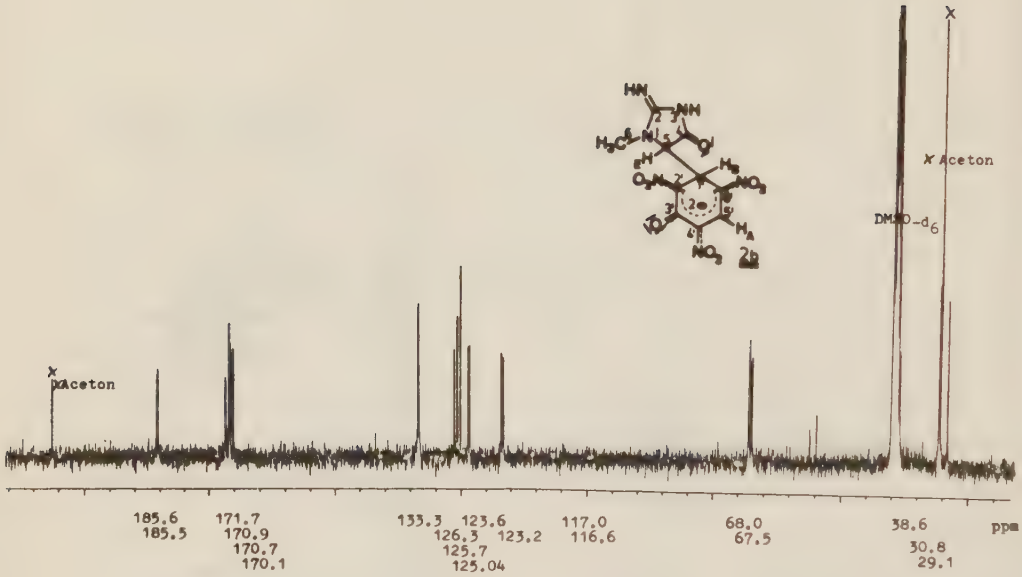


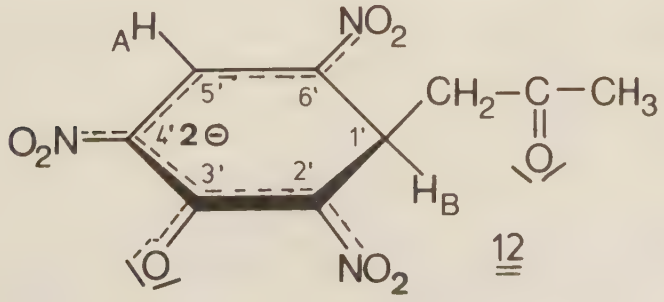
Abb.20: Breitbandentkoppeltes 100,575 MHz-^{13}C-$\{^1H\}$-NMR-Spektrum des Trinitrocyclohexadienat-Adduktes 2b in DMSO-d_6

Beim Vergleich des 20,115 MHz-^{13}C-$\{^1H\}$-NMR-Spektrums von Kreatininpikrat (Abb.17) mit dem 100,575 MHz-^{13}C-$\{^1H\}$-NMR-Spektrum des Trinitrocyclohexadienat-Adduktes 2b erkennt man die größere Zahl der Kohlenstoffsignale. Im Gegensatz zu Kreatininpikrat (7) sind für das MEISENHEIMER Salz 2b für 10 Kohlenstoffe 18 statt 8 unterscheidbar. Das paarweise Auftreten der Signale deutet wie die ^1H-NMR-Messungen von 2b auf die Bildung von Diastereomeren hin. Rotamere, wie KOHASHI et al.[7] vorgeschlagen haben, kommen nicht in Betracht, da sich dann die chemischen Verschiebungen der $N-CH_3$-Gruppe (C-6) und der C=O-Gruppe (C-4) der beiden Rotameren stark unterscheiden würden. Beim einen Rotamer käme

die C=O-Gruppe über dem ehemaligen Pikratring zu stehen und die N-CH_3-Gruppe dann zwischen den Nitrogruppen an C-2' und C-6', entsprechend umgekehrt beim anderen Rotamer (vgl. Abb.13). Das ^{13}C-NMR-Spektrum von 2b in DMSO-d_6 läßt jedoch nur einen minimalen Verschiebungsunterschied von C-4 (0.1 ppm), jedoch einen größeren der N-Methylgruppe (1.7 ppm) erkennen. Das C-4 wird folglich in der gleichen räumlichen Umgebung angeordnet sein, und zwar befindet es sich stets zwischen den beiden Nitrogruppen an C-2' und C-6'.
Die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffe des "Pikratrestes" der MEISENHEIMER Verbindung 2b (Tab.6) stehen in guter Übereinkunft mit den von SCHLECHT und KOVAR[39] gemessenen Verschiebungen der Verbindung 12 (Tab.7).

Tab.7: Zuordnung der chemischen Verschiebung von 12 [ppm]

ppm	Kohlenstoff
170.3	C-3'
132.9	C-5'
128.0	C-2'
123.6	C-4'
118.4	C-6'
34.5	C-1'



12

Tab.6: Zuordnung der ^{13}C-Resonanzen [ppm] des Trinitrocyclohexadienats 2b mit Kopplungskonstanten [Hz]

[ppm]	Multiplizität	Kopplung [Hz]	Zuordnung
185.6	S	--	C-4▲
185.5	S	--	C-4
171.7	S_m	--	C-3'▲
170.9	S_m	--	C-2
170.7	S_m	--	C-3'
170.1	S_m	--	C-2▲
133.3	D	$J_{C-5'/H-5'}$ = 170	C-5',5'▲
126.3	S_m	nicht aufgelöst	C-2'▲
125.7	S_m	nicht aufgelöst	C-2'
125.0	Verunreinigung	im 100,575-NMR-Spektrum	Pikrat,3',5'
123.6	S_m	nicht aufgelöst	C-4'▲
123.2	S_m	nicht aufgelöst	C-4'
117.0	S_m	nicht aufgelöst	C-6'
116.6	S_m	nicht aufgelöst	C-6'▲
68.0	D	$J_{C-5/H-5}$ = 150	C-5
67.5	D	$J_{C-5▲/H-5▲}$ = 150	C-5▲
38.6	verdeckt unter DMSO-d_6-Signal	nicht erkennbar	C-1' oder C-1'▲
30.8	Q	$J_{C-6/H-6}$ = 145	C-6
29.1	Q	$J_{C-6▲/H▲-6'}$ = 145	C-6▲

Die Bildung der MEISENHEIMER Verbindung 2b aus Kreatinin und Pikrinsäure im alkalischen Milieu hebt die Protonierung der Guanidinofunktion des Kreatininyl-Restes bei 7 wieder auf. Die Kohlenstoffe C-2 und C-4 werden dadurch zu tieferem Feld hin verschoben und nehmen Werte ähnlich wie im Kreatinin an. Der C-5 Kohlenstoff ist gegenüber Kreatininpikrat (7) um mehr als 13 ppm tieffeldverschoben. Im gekoppelten Spektrum der Abbildung 19 ist er als Dublett mit einer Kopplungskonstanten von 150 Hz gegenüber dem Triplett von 148 Hz in 7 zu erkennen.
Der C-6 ist geringfügig zu höherem Feld verschoben.
Die Beobachtungen an C-5 und C-6 stimmen auch mit der Messung von DIETRICH, MARLETTA und KENYON[37] eines an C-5 mit einer Methylgruppe substituierten Kreatinins überein.
Neu im 100,575 MHz-^{13}C-NMR-Spektrum der Abbildung 20 ist das Signal bei 38.6 ppm. Es gehört zum Kohlenstoff C-1' der Verbindung 2b, wobei nicht zu entscheiden ist, von welchem der beiden Diastereomerpaare es herrührt. Im 20,115 MHz-^{13}C-NMR-Spektrum (Abb.19) liegt dieses Signal verdeckt unter dem Lösungsmittelsignal.
Die Änderung der Multiplizität von C-5 und das Auftreten des neuen Signals bei 38.6 ppm beweisen die Bildung der Verbindung 2b.

2.3.3.5 Propenid-Addukt

Zur Messung des Propenid-Adduktes 4 wurde die MEISENHEIMER Verbindung 2b in einer 5N (= 20%igen)-NaOD gelöst und ein breitbandentkoppeltes 100,575 MHz-^{13}C-$\{^1H\}$-NMR-Spektrum aufgenommen (Abb.21).

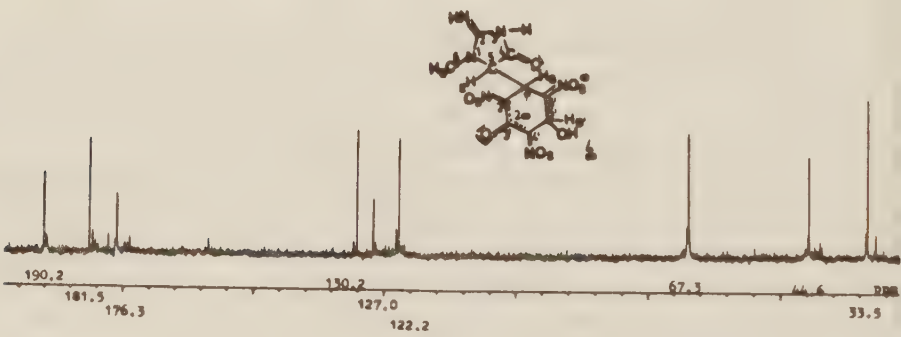


Abb.21: 100,575 MHz-^{13}C-$\{^1H\}$-NMR-Spektrum des Propenids 4 in einer 5N-NaOD, breitbandentkoppelt

Zur Unterscheidung des Substitutionscharakters der einzelnen Kohlenstoffatome wurde noch ein sogenanntes "Gated-Spin-Echo" 100,575 MHz-^{13}C-$\{^1H\}$-NMR-Spektrum der gleichen Probe gemessen. Hierbei weisen sekundäre und quartäre Kohlenstoffsignale "nach unten", zeigen also eine negative Amplitude, wogegen die primären und tertiären Kohlenstoffe "ganz normal" eine positive Amplitude ergeben (Abb.22). Auf der Grundlage dieser beiden Spektren erfolgt die Zuordnung der Kohlenstoffe (Tab.8).
Eine Zersetzung der Verbindung 2b zu den Ausgangsprodukten Kreatinin und Pikrinsäure beim Messen in der 5N-NaOD ist

ausgeschlossen, wie ein Vergleich mit diesen (Abb.15 und 16) zeigt. Der C-5 ist wegen erfolgten Austausches des gebundenen H_E und H_E▲ -Protons gegen Deuterium im Rauschen des Spektrums verschwunden (vgl. Abb.16). Hierfür taucht ein neues Signal bei 67.15ppm auf. Dieses entspricht dem Signal für C-5' und C-5'▲ , das beim Trinitrocyclohexadienat-Addukt 2b bei 133.3 ppm erscheint. C-3' und C-3'▲ (176.3 ppm) zeigen sehr ähnliche chemische Verschiebung wie das entsprechende Kohlenstoffatom der Propenidverbindung 11 (Abb.16) mit 175.2 ppm. Diese Tatsachen bestätigen die Bildung der Propenid-Verbindung 4 aus 2b im stark alkalischen Milieu unter Addition von einem Hydroxid-Ion.

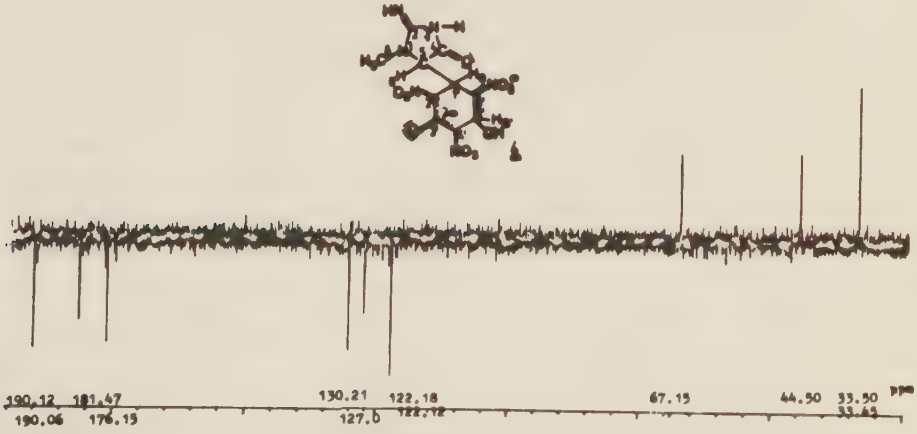


Abb.22: 100,575 MHz-^{13}C-{^1H}-NMR-Spektrum des Propenid-Adduktes 4 in einer 5N-NaOD "Gated-Spin-Echo"-Verfahren

Tab.8: Zuordnung der ^{13}C-Resonanzen des Propenid-Adduktes 4 in ppm

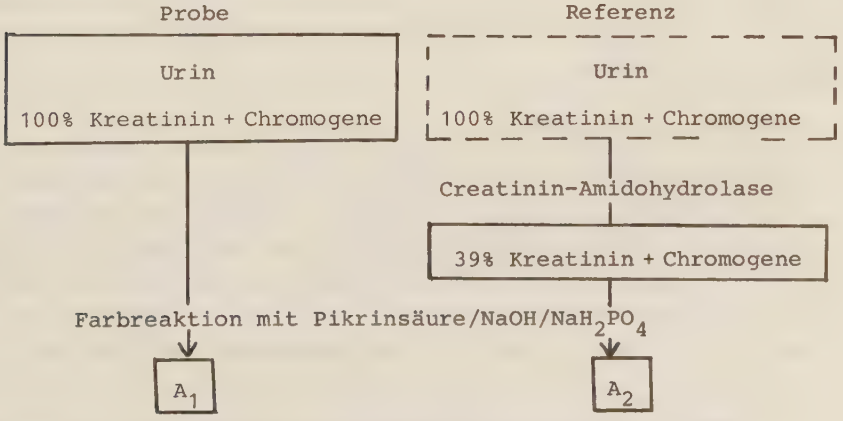
ppm	Kohlenstoff	ppm	Kohlenstoff
190.12	C-4	67.15	C-5' und C-5'▲
190.06	C-4▲	44.50	C-1' und C-1'▲
181.47	C-2 und C-2▲	33.40	C-6
176.15	C-3' und C-3'▲	33.45	C-6▲
130.21	C-2' und C-2'▲		
127.00	C-4' und C-4'▲		
122.18	C-6'		
122.12	C-6'▲		

3 Entwicklung einer neuen Methode zur Gesamtkreatininbestimmung

3.1 Vorarbeiten

3.1.1 Methode SCHMID

SCHMID[8] verbesserte die Kreatininbestimmung nach JAFFE und koppelte sie mit einer enzymatischen Reaktion. Die Optimierung gelang ihm durch Konzentrationsänderung der Reagenzien und durch Wechsel des pH-Wertes. Dabei muß zu Beginn der Reaktion ein möglichst hoher pH vorliegen, weil die Bildung des Kreatininanions der geschwindigkeitsbestimmende Schritt darstellt (siehe 2.2). Die anschließende Verringerung des pH-Wertes mit einer NaH_2PO_4-Lösung auf pH 11,5 verlagert das Gleichgewicht zum MEISENHEIMER Trinitrocyclohexadienat-Addukt und bewirkt eine Verdopplung der Absorption (Abb.23) Die Ausschaltung störender Chromogene wird durch eine Differenzmessung erzielt, wobei die Referenzküvette Creatinin-Amidohydrolase enthält. Mit diesem Enzym stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Kreatinin (39%) und Kreatin (61%) ein. Die Absorptionsdifferenz erfaßt somit 61% des absoluten Kreatiningehaltes, und die Chromogene werden eliminiert (Schema 1).



Schema 1: Bestimmung von Kreatinin im Harn nach SCHMID

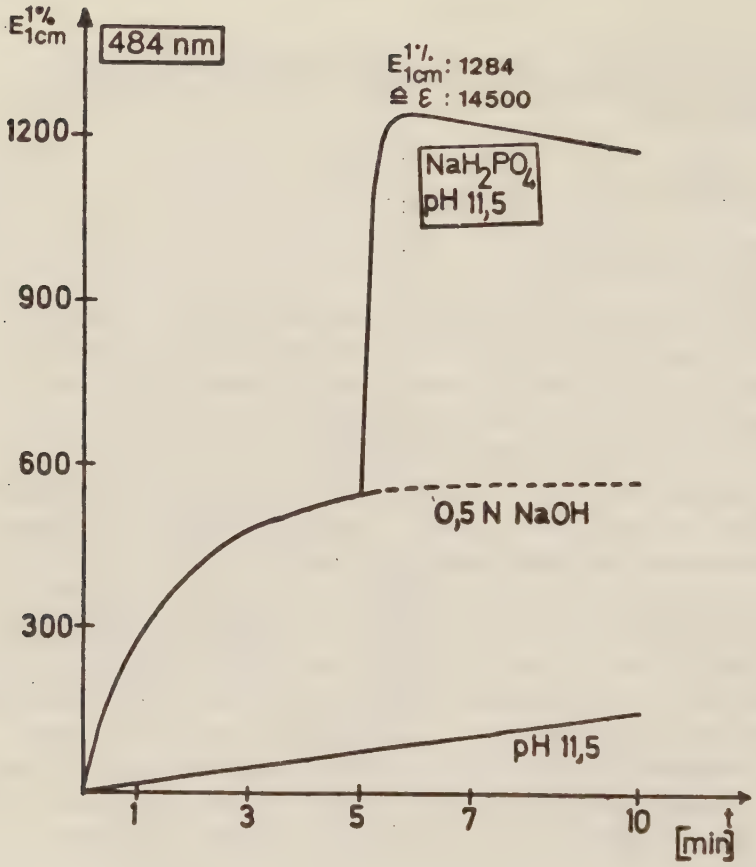


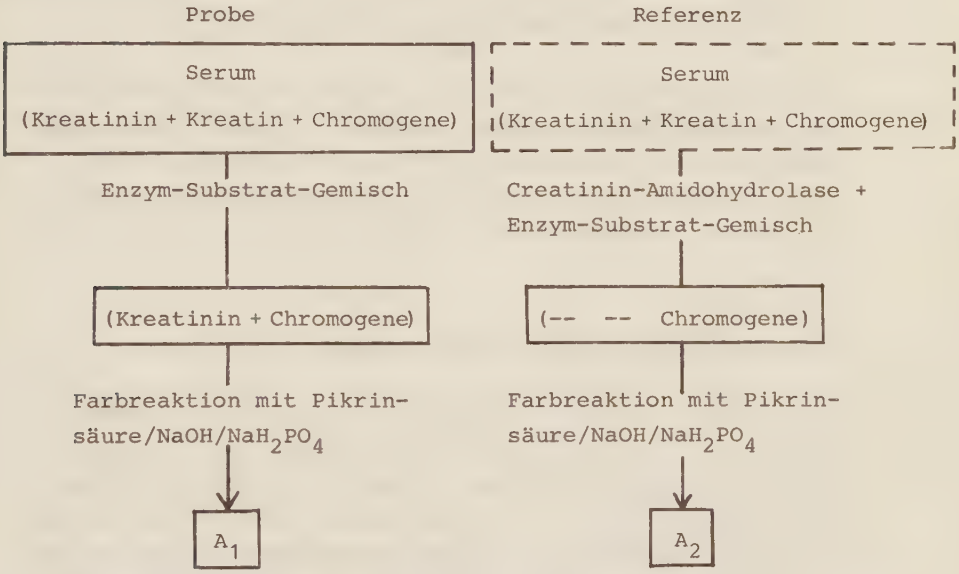
Abb.23: Absenkung des pH-Wertes einer JAFFE-Reaktionslösung mit einer NaH_2PO_4-Lösung, Beobachtung der Extinktionsänderung

Die Vorteile dieser Methode liegen in der Genauigkeit, der Schnelligkeit und der größeren Empfindlichkeit gegenüber den früher üblichen Konventionsmethoden. Nachteil der Methode ist, daß das im Serum vorhandene Kreatin die Bestimmung stört. Aus diesem Grund wurde die Methode SCHMID speziell für die klinische Harnuntersuchung entwickelt. Sie ist zur Überprüfung der Vollständigkeit von 24 h Urinsammlungen sehr gut geeignet,

da das im Serum vorhandene Kreatin im Urin normalerweise nicht ausgeschieden wird, sondern in den Nierenglomeruli vollständig rückresorbiert wird.

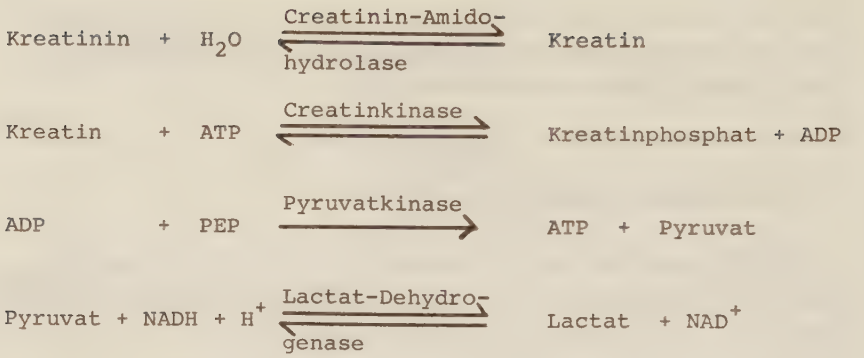
3.1.2 Methode LÖHBERG

LÖHBERG schaltete den Kreatinfehler, der bei der Methode SCHMID im Serum auftreten kann, durch eine Enzymkombination aus.



Schema 2: Bestimmung von Kreatinin im Serum und Urin nach LÖHBERG

In der Probe- und Referenzküvette wird das Kreatin durch ein Enzym-Substrat-Gemisch und in der Referenzküvette zusätzlich das Kreatinin entfernt (Schema 3). Die Absorptionsdifferenz Δ A ergibt den absoluten (100%) Kreatiningehalt im Serum und Urin.



Schema 3 Vollenzymatische Umsetzung von Kreatinin und Kreatin mit dem Enzym-Substrat-Gemisch

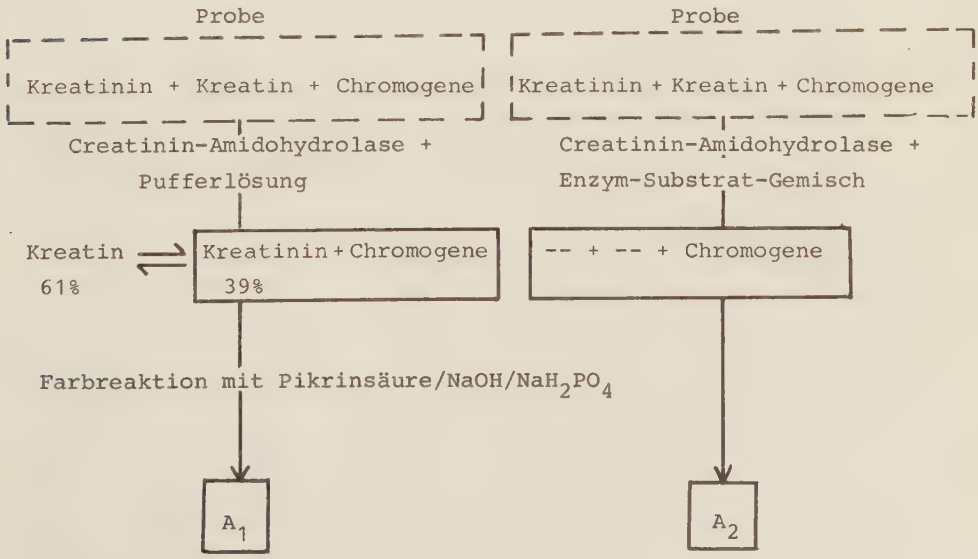
Gegenüber der Methode SCHMID besitzt die Methode LÖHBERG die größere Empfindlichkeit, weil im Vergleich zur Methode SCHMID nicht nur mehr ein bestimmter Prozentsatz (61%), sondern die gesamte Kreatininmenge erfaßt wird. Die Methode ist jedoch aufwendiger.

3.2 Ausarbeitung einer neuen Methode

Zur Gesamtkreatininbestimmung in der Lebensmittelchemie muß das gesamte Kreatin durch eine zeitaufwendige 1stündige HCl-Behandlung in Kreatinin umgewandelt werden. Da diese Vorbehandlung nicht nur zeitaufwendig, sondern auch störanfällig und arbeitsintensiv ist, wird einerseits angestrebt, die Methoden nach SCHMID und LÖHBERG auf die Bestimmung des Gesamtkreatiningehalts in fleischextrakthaltigen Lebensmitteln mit HCl-Behandlung der Proben zu übertragen, andererseits wird versucht, die HCl-Behandlung zu umgehen und damit den Zeitaufwand wesentlich zu reduzieren.
Die Ausarbeitung einer neuen Methode beruht auf der Überlegung, daß das Enzym Creatinin-Amidohydrolase eine Gleichgewichtseinstellung zwischen Kreatinin und Kreatin im wäßrigen Milieu bewirkt. Aus diesem Grund ergeben gleiche molare Mengen

an Kreatinin und/oder Kreatin nach Zugabe von Creatinin-Amidohydrolase unter gleichen Versuchsbedingungen eine gleich starke Farbstoffausbildung, wenn anschließend die Lösung nach JAFFE bestimmt wird, wobei die nachfolgende Zugabe der Reagenzien wegen der Inaktivierung des Enzyms die Gleichgewichtslage fixiert.

Das Prinzip der neuen Methode beruht darauf, daß in der Probe durch die Zugabe von Creatinin-Amidohydrolase ein Gleichgewicht zwischen Kreatinin und Kreatin eingestellt wird. Die Ausschaltung störender Chromogene wird durch eine Differenzmessung erzielt. Die Referenzküvette enthält dabei ein Enzym-Substrat-Gemisch, welches Kreatinin und Kreatin enzymatisch entfernt. In der Probenküvette werden somit Kreatinin und Chromogene, in der Referenzküvette nur die Chromogene gemessen. Die Absorptionsdifferenz Δ A entspricht infolgedessen einer bestimmten Kreatininmenge (= 39% des Gesamtkreatiningehalts)(Schema 4).



Δ A = 39% des Gesamtkreatiningehalts

Schema 4: Prinzip der Gesamtkreatininbestimmung

Der Vorteil der neuen Methode liegt im Umgehen der zeitaufwendigen (1stge.) säurekatalytischen Umwandlung des Kreatins in Kreatinin. Nachteilig wirkt sich aus, daß die Einstellung des Gleichgewichts auf Kosten der Empfindlichkeit geht, da man nur 39% des Gesamtkreatinins erfaßt. Diese geringere Empfindlichkeit wird jedoch zum Teil durch die nach KOVAR, SCHMID und LÖHBERG vorgenommene Optimierung der JAFFE-Reaktion wieder wettgemacht (Steigerung von $E^{1\%}_{1cm}$ auf über das Doppelte).
Einen Vergleich der Prinzipien der neuen Methode und der Methoden SCHMID und LÖHBERG zeigt Abbildung 24.

Methodenvergleich

Methode SCHMID		Methode LÖHBERG		Neue Methode	
Probe	Referenz	Probe	Referenz	Probe	Referenz
Kreatinin	Kreatinin	Kreatinin (Kreatin)	Kreatinin (Kreatin)	Kreatinin Kreatin	Kreatinin Kreatin
Chromogene	Chromogene	Chromogene	Chromogene	Chromogene	Chromogene
		Enzym-Substrat-Gemisch	Enzym-Substrat Gemisch	Puffer	Enzym-Substrat-Gemisch
--- (Glycerol-lösung)	Creatinin-amidohydro-lase	--- (Glycerol-lösung)	Creatinin-amidohydro-lase	Creatinin-amidohydro-lase	Creatinin-amidohydro-lase
Inkubationszeit 10 Minuten bei 30°C					
Zugabe von 1N-Natronlauge, Pikrinsäurelösung 14 mmol/l, 5 min. Inkubationszeit bei 30°C					
Zugabe von 9proz. Natriumdihydrogenphosphat-Lösung, Messung der Extinktion nach 2 min. bei 484 nm, 30°C. Auswertung der Ergebnisse mit einer Eichgeraden					
A_1	A_2	A_1	A_2	A_1	A_2

Differenz $A_{1\,(Probe)} - A_{2\,(Referenz)}$ ergibt den Kreatiningehalt

Abb.24:

3.2.1 Bestimmung der Pufferwirkung einer klaren Fleischsuppe

Reaktionen, an denen Enzyme beteiligt sind, müssen stets bei einem nahezu konstanten pH-Wert durchgeführt werden, da die Gleichgewichtslage einer Reaktion, die enzymatisch katalysiert wird, je nach pH-Bereich verschieden ist.
Bei den Messungen nach der Methode LÖHBERG arbeitet man mit menschlichem Serum als Probenlösung, das durch die in der Blutflüssigkeit vorhandenen Puffersysteme auf einem in engen Grenzen gleichbleibenden pH-Wert von etwa 7,4 gehalten wird. Dieser pH-Bereich fällt mit dem Optimum der in der Methode zum "Abbau" des Kreatinins über Kreatin benutzten gekoppelten Enzymreaktion zusammen, so daß sich bei der Methode LÖHBERG ein Pufferzusatz erübrigt.
Um zu prüfen, wie die Sachlage bei der Verwendung von fleischextrakthaltigen Lebensmitteln sich darstellt, wurde der pH-Wert verschiedener Konzentrationen an klarer Fleischbrühe ermittelt und die Pufferwirkung durch Säure- und Laugenzugabe geprüft. Die pH-Erkennung wurde mit Hilfe eines zuvor mit Standardpufferlösungen geeichten pH-Meters an Hand einer Glaselektrode vorgenommen (Tab.9).

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, bewegten sich die pH-Werte um etwa pH = 6. Nach Zugabe von 1 Tropfen an 10proz. NaOH ergaben sich pH-Werte zwischen 10,8 und 9,5, nach Zugabe von 1 Tropfen 18proz. HCl lagen die pH-Werte zwischen 2,5 und 3,8.

Tab.9: pH-Werte und Pufferwirkung einer klaren Fleischsuppe

Einwaage [g/20 ml H_2O]	pH-Wert	pH-Wert nach Zugabe von 1 Tr. 10% NaOH	pH-Wert nach Zugabe von 1Tr.18%HCl
0,1	6,1	10,8	2,5
0,2	6,1	10,6	3,2
0,4	6,0	10,2	3,6
0,6	5,9	10,0	3,8
0,8	5,8	9,8	3,9

Geringe Zugabe an Säure oder Lauge veränderten den Ausgangs-pH-Wert stark. Hiermit kann gefolgert werden, daß die Pufferkapazität der Fleischbrühe gering ist.
Um jedoch einen konstanten pH-Wert im Bereich von 7,5 bis ungefähr 9 bei der Umsetzung des Kreatinins und des Kreatins in der gekoppelten enzymatischen Reaktion zu gewährleisten, muß also der Lösung bei der Bestimmung ein geeigneter Puffer zugesetzt werden.

3.2.2 Messungen mit Tetraborat-Puffer (pH 9)

In Vorversuchen, bei denen analog den Arbeiten LÖHBERG und SCHMID die Gleichgewichtslage zwischen Kreatinin und Kreatin nach Zugabe von Creatininamidohydrolase ermittelt werden sollte, ergaben sich bei der Verwendung einer 0,005 molaren Natriumtetraboratlösung Werte, die bei einem pH-Wert von 9 ein Verhältnis Kreatinin zu Kreatin von nahzu 1 : 1 ergaben, d.h. 50% liegen als Kreatinin vor.

Mit diesem Tetraboratpuffer wurde versucht, nach dem folgenden Pipettierschema die Extinktionen äquimolarer Mengen an Kreatinin, Kreatin und Gemischen der beiden Substanzen zu bestimmen.

Pipettierschema:

	Probe [µl]	Referenz [µl]
wäßrige Probelösung	50	50
Enzym-Substrat-Puffer	--	50
Tetraboratpuffer 0,005 molar	50	--
Creatininamidohydrolase	10	10

Weitere Versuchsdurchführung wie Methode LÖHBERG

Die so gemessenen Werte der ersten Versuchsreihen mit 20, 40, 60 µmol/l Kreatinin, Kreatin oder verschieden zusammengesetzten Gemischen der beiden ergaben sehr starke Schwankungen der gemessenen Extinktionen, so daß der Versuch abgebrochen wurde. Als Erklärung für die Abweichungen bieten sich eine mögliche Hemmung der enzymatischen Umsetzung durch Tetraborat oder dessen Umsetzung mit den verschiedenen Reagenzlösungen an.
Deshalb wurde der Versuch mit einer geänderten Pufferlösung unternommen.

3.2.3 Geänderte Pufferlösung zur Bestimmung (Glycylglycin-Puffer pH 8)

Pipettierschema

	Probe [µl]	Referenz [µl]
wäßrige Probenlösung	100	100
Enzym-Substrat-Puffer-Wasser (1 + 1 + 1 + 7)	--	100
"Boehringer"-Puffer-Wasser (1 + 9)	100	--
Creatinin-Amidohydrolase	10	10

Weitere Durchführung wie Methode LÖHBERG

Tab.10: Extinktionswerte von äquimolaren Mengen Kreatin Kreatinin und Gemischen der beiden

	[µmol/l]	Extinktion (bei 484 nm)
Kreatinin	20	0,127
Kreatin	20	0,126
Gemisch Kreatinin/Kreatin 6:4	20	0,128
Gemisch Kreatinin/Kreatin 4:6	20	0,126
Kreatinin	30	0,155
Kreatin	30	0,157
Gemisch Kreatinin/Kreatin 2:8	30	0,158

Die Werte (Tab.10) zeigen, daß gleiche Mengen an Kreatin und Kreatinin nach der Einwirkung der Creatinin-Amidohydrolase eine gleichstarke Farbstoffausbildung bei der anschließenden JAFFE-Reatkion geben.

3.2.4 Eichgeradenerstellung nach der neuen Methode

Zur Erstellung einer Eichgerade nach der neuen Methode wurden wäßrige Kreatininlösungen verschiedener Konzentration untersucht. Die Auflistung der Meßwerte, die Regressionsgerade und das Pipettierschema sind im Experimentellen Teil aufgeführt.

3.3 Bestimmung gesamtkreatininhaltiger Proben

3.3.1 Bestimmung nach der neuen Methode und der Methode LÖHBERG

Die nachfolgende Tabelle 11 bringt einen Vergleich der nach der Methode LÖHBERG und der neuen Methode bestimmten Gesamtkreatininkonzentration verschiedener Lebensmittelproben (Methode LÖHBERG wurde ohne Vorbehandlung, d.h. ohne vorherige Umwandlung des Kreatins in Kreatinin zu Ermittlung des absoluten Kreatiningehalts der Probe benutzt, um ein eventuell vorhandenes, konstantes Verhältnis Kreatin zu Kreatinin zu ermitteln).

Tab.11: Vergleich der nach Methode LÖHBERG und neuer Methode bestimmten Gesamtkreatininkonzentration verschiedener Lebensmittelproben

Einwaage in [g]	Extinktion 1	Extinktion 2	Gesamtkreatinin [%] Gehalt 1	Kreatinin [%] Gehalt 2
Fleischsuppe I 1,9700	0,254	0,391	0,332	0,197
Fleischsuppe II 2,0212	0,239	0,347	0,304	0,171
Bratensaft I 0,4710	0,032	0,026	0,171	0,051
Bratensaft II 0,4735	0,036	0,015	0,091	0,027
Tomatencremesuppe 2,035	0,002	0,001	--	--

1 = Neue Methode, 2 = Methode LÖHBERG

Der Vergleich der nach der neuen Methode und der nach der Methode LÖHBERG ermittelten Werte zeigt, daß -wie erwartet- bei der Methode LÖHBERG ohne Vorbehandlung ein Mindergehalt in Bezug auf den Gesamtkreatiningehalt gefunden wird. Interessanterweise findet man mit der neuen Methode bei der Probe "Klarer Bratensaft" eine höhere Extinktion als mit der Methode LÖHBERG. In dieser Probe wird die geringere Empfindlichkeit der neuen Methode zur Methode LÖHBERG (39% zu 100%) durch das Verhältnis Kreatin zu Kreatinin offensichtlich wettgemacht. Im klaren Bratensaft liegt somit aufgrund der Verarbeitung bzw. der Herstellung ein hoher Kreatingehalt im Vergleich zum Kreatiningehalt vor. Gleichzeitig ist kein konstantes Verhältnis von Kreatinin zu Kreatin zu erkennen. Beide Methoden geben auch bei der Probe "Tomatencremesuppe" keinen falschen Kreatiningehalt. Tomatensuppen täuschen, obwohl sie von der Herstellung und den Ausgangsprodukten her kein Kreatinin enthalten, häufig einen scheinbaren Kreatiningehalt vor. Dies rührt von störenden Substanzen her (CARISANO[15]).

3.3.2 Bestimmung des Gesamtkreatiningehalts nach der Methode HADORN

Die Methode HADORN[16] stellt eine der Standardmethoden zur Gesamtkreatininbestimmung dar.
Mit dieser Methode wurde eine klare Fleischsuppe ohne und mit Kreatininzusatz bestimmt (Tab.12).

Tab.12: Bestimmung des Gesamtkreatiningehalts einer klaren Fleischsuppe mit der Methode HADORN

Einwaage [g]	Kreatininzusatz [µg/ml]	Extinktion	Gesamtkreatinin [µg/ml]	Gesamt-kreatinin [%]
1,1585	---	0,070	3,42	0,2952
1,9740	---	0,132	6,45	0,3267
1,0685	0,5	0,082	4,00	0,3275
1,9870	0,3	0,140	6,84	0,3291

Die Berechnung des Gesamtkreatiningehaltes in Prozent der Probenmenge erfolgte nach der Gleichung:

$$\% \text{ Gesamtkreatinin} = \frac{a \cdot 1000}{e}$$

a = Gesamtkreatinin in [µg]
e = Einwaage der Probe in [mg]

3.3.3 Bestimmung gesamtkreatininhaltiger Proben nach den Methoden SCHMID (Mikro), LÖHBERG und der neuen Methode

3.3.3.1 Fleischextrakt

Die Bestimmung eines homogenisierten Fleischextraktes ergab die in der Tabelle 13 aufgeführten Werte.

Tab.13: Gesamtkreatiningehalt eines Fleischextraktes

	Methode SCHMID	Methode LÖHBERG	Neue Methode
Gesamtkreatiningehalt in Gewichtsprozent	7,018	7,046	6,968
Einwaage in [g]	10,190	10,190	10,190
Extinktion, Mittelwert	0,900	0,720	0,276
Abweichung der neuen Methode in [%]	0,717	1,119	---

Da ohne Vorbehandlung der Proben nach den Methoden SCHMID und LÖHBERG keine Gesamtkreatininbestimmung erfolgen kann, wurde vor den Bestimmungen durch eine säurekatalytische Umwandlung des Kreatins in Kreatinin die Bestimmung ermöglicht (vgl. 6.9.2). Man erkennt die gute Übereinstimmung der neuen Methode mit den beiden anderen (Tab.13) Methoden.

3.3.3.2 Bestimmung einer klaren Fleischsuppe, eines Bratensaftes und einer gebundenen Ochsenschwanzsuppe und Vergleich mit dem deklarierten Wert

Die Bestimmung dreier homogenisierter Proben ergab die in der Tabelle 14 aufgeführten Werte. Gleichzeitig wird der in einem Ringversuch ermittelte durchschnittlich gefundene Wert gegenübergestellt.

Tab.14: Bestimmung einer klaren Fleischsuppe, eines Bratensaftes und einer gebundenen Ochsenschwanzsuppe

Art der Probe	Gesamtkreatiningehalt in Gewichtsprozent			
	"Deklariert"	SCHMID(Mikro)	LÖHBERG	Neue Methode
Klare Fleischsuppe	0,35 - 0,40	0,388	0,407	0,409
Bratensaft	0,20 - 0,25	0,198	0,224	0,226
Gebundene Ochsenschwanzsuppe	0,08 - 0,12	0,103	0,109	0,099

(Probenvorbehandlung siehe 6.9.1 und 6.9.2).
Beim Vergleich der ermittelten Werte mit den deklarierten läßt sich die gute Übereinstimmung derselben erkennen.

3.3.4 Messung von 10 verschiedenen Proben nach der neuen Methode und Vergleich der Werte mit der HPLC-Methode[40)]

Die Bestimmung der 10 homogenisiert und gelöst angelieferten Proben Kreatin/Kreatinin, zwei verschiedener Fleischextrakte, einer Trinkbouillon, einer Klaren Fleischsuppe, einer Bouillon, eines Bratensaftes, einer Soße zum Braten, einer Ochsenschwanzsuppe und einer Kalbfleischsuppe nach der neuen Methode im Vergleich mit den erhaltenen Werten nach der HPLC-Methode[40)] zeigt Tabelle 15.

Tab.15: Meßwerte von 10 Proben nach der neuen Methode im Vergleich mit der HPLC-Methode[40)]

Probennummer und Art	Gesamtkreatinin in [%]	
	Neue Methode	HPLC
(1) Kreatin/Kreatinin	0,096	0,099
(2) Fleischextrakt Nr. 1	2,262	2,21
(3) Fleischextrakt Nr. 2	2,415	2,31
(4) Trinkbouillon	0,637	0,543
(5) Klare Fleischsuppe	0,046	0,0454
(6) Bouillon	0,089	0,0831
(7) Bratensaft	0,035	0,0371
(8) Soße zum Braten	0	< 0,002
(9) Ochsenschwanzsuppe	0,030	0,0307
(10) Kalbfleischsuppe	0,038	0,0397

Nur im Falle der Trinkbouillon zeigt sich ein nennenswerter Unterschied der ermittelten Werte. Ansonsten bewegen sich die Differenzen im Bereich von maximal ± 5%, mit Ausnahme der erwähnten Trinkbouillon mit + 14,76%, der Bouillon mit + 6,63 und des Bratensaftes mit - 5,66%. Diese Unterschiede hängen sehr wahrscheinlich mit dem nach der neuen Methode erfolgten Ergänzen einer bestimmten Probenlösungsmenge auf ein definiertes Volumen in einem Meßkolben zusammen.

4 Allgemeiner Methodenvergleich

4.1 Vergleich der spezifischen Extinktionen der neuen Methode mit den Methoden SCHMID, LÖHBERG und HADORN

Die spezifische Extinktion $E^{1\%}_{1cm}$ einer gelösten Substanz ist die Extinktion einer 1proz. Lösung, bei einer Schichtdicke von 1 cm und bei einer bestimmten Wellenlänge gemessen.
Es gilt:

$$E^{1\%}_{1cm} = \frac{E}{c \cdot d}$$

Die Konzentration c (%) bezieht sich hier auf die Endkonzentration an Kreatinin im Testansatz.

Tab.16: Vergleich der spezifischen Extinktionen der Methoden SCHMID, LÖHBERG, neue Methode und der Methode HADORN

	$E^{1\%}_{1cm}$	Meßwellenlänge [nm]
LÖHBERG	1234,0	484
SCHMID (Mikro)	785,0	484
Neue Methode	473,7	484
HADORN	230,0	546

Einen Empfindlichkeitsvergleich der vier Methoden bringt Abbildung 25.
Wie aus Tabelle 16 ersichtlich ist, liegt die spezifische Extinktion der neuen Methode wesentlich niedriger als die der Methoden LÖHBERG und SCHMID. Sie ist jedoch fast doppelt so empfindlich wie die Methode HADORN.

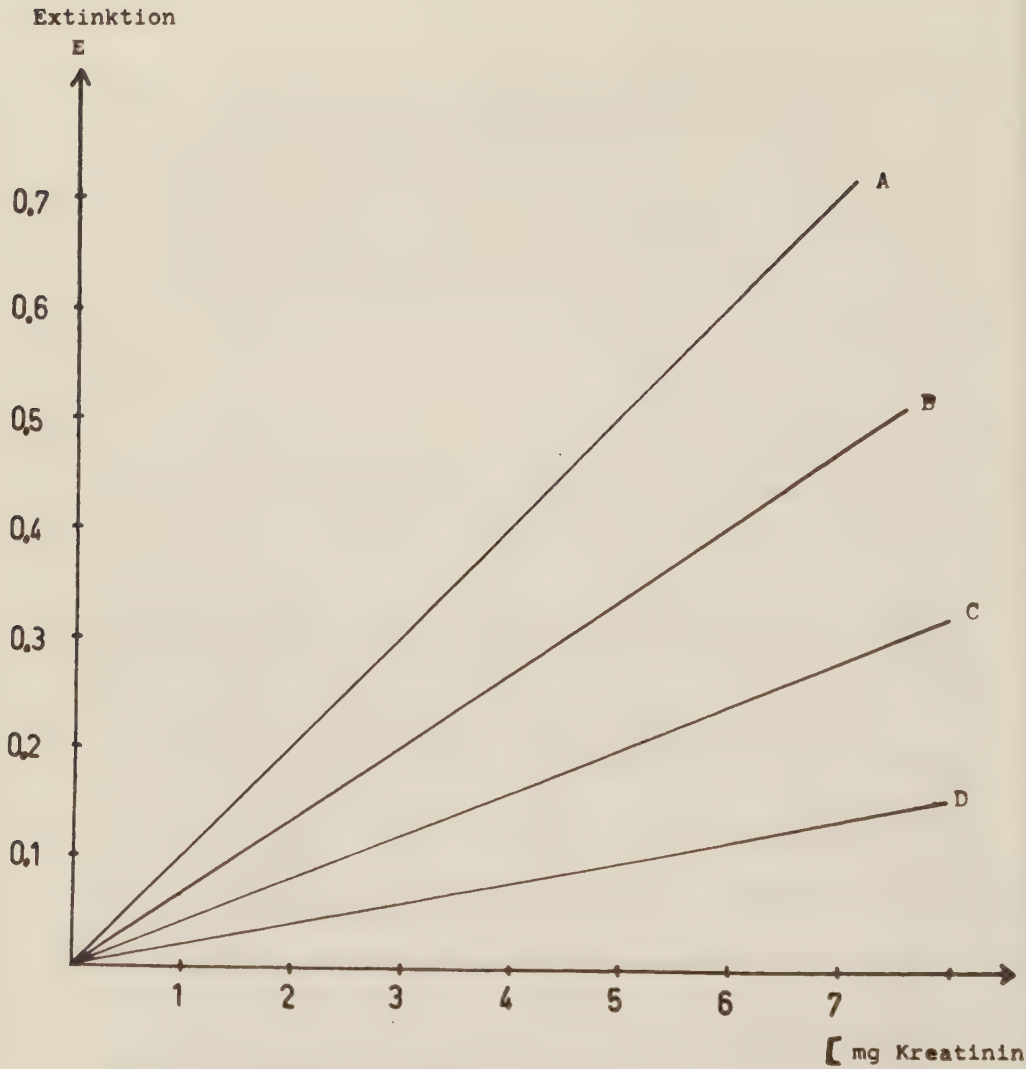


Abb.25: Vergleich der Eichgeraden der vier Methoden

A = Methoden LÖHBERG $y = 0{,}100\ x + 0{,}002$

B = Methode SCHMID $y = 0{,}125\ x + 0{,}006$*

C = Neue Methode $y = 0{,}039\ x + 0{,}001$*

D = Methode HADORN $y = 0{,}020\ x + 0{,}002$*

* Die anderen Endvolumina wie Methode A wurden bei der Zeichnung der Geraden mitberücksichtigt.

4.2 Vergleich der Präzision

4.2.1 Präzision in Serie

Ein Vergleich der Präzision in Serie (Tab.17) zeigt, daß eine Präzision ähnlich der Methode LÖHBERG gegeben ist.

Tab.17: Präzision in Serie nach den Methoden SCHMID, LÖHBERG und der neuen Methode

Variationskoeffizient in Serie in [%]	Konzentration [mg Kreatinin/100 ml]	Methode
1,35	0,86	SCHMID
3,36	0,93	LÖHBERG
2,27	2,05	LÖHBERG
2,11	4,85	LÖHBERG
3,06	0,90	Neue Methode
2,61	5,81	Neue Methode
2,09	9,32	Neue Methode

4.2.2 Präzision von Tag zu Tag

Die Präzision von Tag zu Tag beträgt nach der Methode SCHMID bei einer Kreatininkonzentration von 0,81 mg/100 ml 1,65% (= VK). Die Methode LÖHBERG besitzt bei einer Kreatininkonzentration von 2,05 mg/100 ml einen Variationskoeffizienten von 3,19%. Die Präzision von Tag zu Tag hat nach der neuen Methode bei einer Kreatininkonzentration von 9,32 mg/100 ml den Wert von 2,81% (= VK).

4.3 Vergleich der neuen Methode mit anderen üblichen Methoden zur Gesamtkreatininbestimmung in der Lebensmittelchemie

Die verschiedenen Methoden sollen nach folgenden Kriterien beurteilt werden:

- Zeitbedarf (gesamt)
- Probenvorbereitung
- Meßprinzip und Ergebnisermittlung

Der Zeitbedarf stellt eines der wichtigsten Kriterien dar, da eine schnelle Ermittlung eines Wertes die Zahl der pro Zeiteinheit durchführbaren Bestimmungen erhöht.

Die Probenvorbereitung beeinflußt zwei Dinge:
zum einen die Gesamtzeit je Messung,
zum anderen den Materialaufwand bzw. die Praktikabilität.

Das Meßprinzip muß eine ausschließliche und exakte Erfassung der gesuchten Konzentration einer bestimmten Substanz gewährleisten.
Die Ergebnisermittlung sollte einfach und ohne großen Aufwand möglich sein.
Einen Vergleich bringt Tabelle 18.

Tab.18: Methodenvergleich

	1	2	3	4	5	6
Meßprinzip	Komb. Enzym-JAFFE	HPLC	Ionenaus-tauscherchr.	Vollenzy-matisch	JAFFE	Vollenzy-matisch
Meßwellenlänge [nm]	484	234	240	340	546	340 (365/334)
Säurekatalyt. Umwand-lung Kreatin → Kreatinin	nicht nötig	ja	ja	nicht nötig	ja	nicht nötig
Zeitbedarf (ohne Proben-vorbereitung) in [min]	17	ca. 5	nicht be-kannt	40	ca.90	40
Probenvorbereitung - Dauer	kurz	lang	lang	kurz	lang	kurz
Küvettenart	Einweg	--	--	UV	Einweg	UV

1 = Neue Methode
2 = BATTAGLIA
3 = CARISANO
4 = ETTEL/TUOR
5 = HADORN
6 = BOEHRINGER

4.4 Vorteile der neuen Methode zur Gesamtkreatininbestimmung

Die Vorteile der neuen Methode sind:

- Einfachheit der Probenvorbereitung
- Geringer Zeitbedarf
- Gebrauch handelsüblicher Reagenzien
- Messung in Einwegküvetten

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird der Reaktionsablauf der JAFFE-Reaktion mit Hilfe von ^{1}H(400 MHz)- und ^{13}C-NMR-Messungen überprüft und eine Gesamtkreatininbestimmung im Mikromaßstab beschrieben, die die Spezifität enzymatischer Verfahren mit der Schnelligkeit des JAFFE-Tests verbindet.

Die Gesamtkreatininbestimmung besitzt in der Lebensmittelüberwachung eine große Bedeutung, da fleischextrakthaltige Lebensmittel qualitativ nach ihrem Gehalt an Gesamtkreatinin beurteilt werden. Unter Gesamtkreatinin versteht man hierbei die Summe des aus Muskelfleisch extrahierten Kreatins und dessen durch Wasserabspaltung unter Zyklisierung entstandenen Umwandlungsproduktes Kreatinin. Die meisten der in der Lebensmittelchemie üblichen Methoden zur Gesamtkreatininbestimmung beruhen auf der Reaktion nach JAFFE. Diese Bestimmung wird durch eine Reihe anderer Stoffe, der sogen. "Chromogene", verfälscht. M. SCHMID (1979) optimierte in Kenntnis des Reaktionsmechanismus nach ELLINGER, SEIDEL und KOVAR (1976) die JAFFE-Reaktion und schaltete durch eine Differenzmessung den durch die "Chromogene" bedingten Fehler aus. Der bei der Bestimmung im Serum auftretende "Kreatinfehler" wurde von G. LÖHBERG (1980) durch Zusatz weiterer Enzyme und Substrate behoben. Aufgrund dieser Vorarbeiten wurde eine Methode zur Bestimmung des Gesamtkreatiningehaltes von fleischextrakthaltigen Lebensmitteln ausgearbeitet.

Da einige Passagen des Reaktionsablaufes der JAFFE-Reaktion umstritten sind (KOHASHI 1979), wurden weitere ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Untersuchungen durchgeführt. Hierbei konnte der von KOVAR u.Mitarb. vorgeschlagene Reaktionsmechanismus bestätigt und darüberhinaus die Konfiguration und Konformation der resultierenden Produkte verdeutlicht werden.
Die Problematik der JAFFE-Reaktion liegt darin, daß unter den Reaktionsbedingungen 2 verschiedene MEISENHEIMER Verbindungen

entstehen, von denen nur das Trinitrocyclohexadienat-Addukt bei 484 nm absorbiert, während das Propenid-Salz ein Maximum bei 384 nm aufweist. Beide MEISENHEIMER Strukturen zeigen im Kernresonanz Signalverdopplungen, die auf Diastereomere zurückzuführen sind. Aus räumlichen Gründen ist ein bestimmtes Rotamer bevorzugt, wobei die N-Methylgruppe des Kreatininyl-Restes über dem Trinitrocyclohexadienat-Ring zu stehen kommt.

Das Prinzip der entwickelten Methode beruht auf der Zugabe von Creatinin-Amidohydrolase in die Probenlösung. Dadurch stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Kreatinin und Kreatin (39:61) ein. Die Ausschaltung störender "Chromogene" wird durch eine Differenzmessung erzielt, wobei in der Referenzlösung ein Enzym-Substrat-Gemisch Kreatinin und Kreatin der Bestimmung entzieht. Die Absorptionsdifferenz zwischen Proben- und Referenzlösung entspricht somit einer bestimmten Kreatininmenge (= 39% des Gesamtkreatiningehaltes), da in der Probenküvette Kreatinin und Chromogene und in der Referenzküvette nur die Chromogene erfaßt werden. Die gemessene Absorption wird über eine Eichgerade, erstellt mit wäßriger Kreatininlösung, ausgewertet. Der Vorteil der neuen Methode liegt im Umgehen der zeitaufwendigen säurekatalytischen Umwandlung von Kreatin in Kreatinin. Allerdings wirkt es sich nachteilig aus, daß die Einstellung des Kreatinin-Kreatin-Gleichgewichts auf Kosten der Empfindlichkeit geht, da man nur 39% des Gesamtkreatinins erfaßt. Diese geringere Empfindlichkeit wird jedoch zum Teil durch die Optimierung der JAFFE-Reaktion (Verdopplung der Extinktion) wieder wettgemacht.
Zur Beurteilung seiner Qualität wurde der entwickelte Test einer eingehenden Prüfung unterzogen. Die Bestimmung ist mindestens bis zu einer Kreatininkonzentration von 14 mg/100 ml ≙ 1238 µmol/l linear.
Zur Beurteilung der Richtigkeit wurden Misch- und Vergleichsversuche durchgeführt. Der Gesamtkreatiningehalt von Fleischextrakt, klarer Fleischsuppe, Bouillon, Trinkbouillon, Bratensaft, Ochsenschwanz- und Kalbfleischsuppe, Soße zum Braten

und Tomatencremesuppe (ohne Kreatiningehalt) wurde ermittelt und mit anderen Methoden verglichen, wobei weitgehende Übereinstimmungen erzielt wurden.

Das Maß für die Präzision in Serie, der Variationskoeffizient, betrug

3,06% ($\bar{x}$ = 0,899 mg/100 ml $\hat{=}$ 79,5 µmol/l; n = 20)
2,61% ($\bar{x}$ = 5,810 mg/100 ml $\hat{=}$ 513,6 µmol/l; n = 20)
2,09% ($\bar{x}$ = 9,320 mg/100 ml $\hat{=}$ 823,9 µmol/l; n = 20)

und bei der Bestimmung von Tag zu Tag (an 20 aufeinanderfolgenden Tagen)

2,81% ($\bar{x}$ = 9,320 mg/100 ml $\hat{=}$ 823,9 µmol/l).

6 Experimenteller Teil

6.1 Synthese und Isolierung der Verbindung 2b und von Kreatininpikrat (7)

6.1.1 Versuch der Herstellung nach der Vorschrift von KOHASHI et al.[7)]

Zu einer Lösung von 0,5 g Kreatinin und 2,3 g Pikrinsäure in 100 ml H_2O wird 1,0 g gepulvertes NaOH hinzugegeben. Die Mischung wird 15 min bei 25° gerührt und dann filtriert. Anschließend gibt man 300 ml Methanol hinzu. Der entstehende "Rote Niederschlag" wird abfiltriert, mehrmals mit Methanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Es zeigte sich, daß beim Vorgehen nach dieser Vorschrift der "Rote Niederschlag" nicht zu synthetisieren war. Ließ man die Reaktionslösung mehrere Tage im Kühlschrank stehen, so ergaben sich ein paar rote Kristalle am Flüssigkeitsrand und am Boden des Gefäßes. Die angegebene Ausbeute von 2,5 g konnte in keiner Weise nachvollzogen werden. Da nach der Vorschrift die Herstellung des "Roten Niederschlages" so nicht gelang, wurde eine andere Herstellungsweise gewählt.

6.1.2 Synthese der Verbindung 2b in natronalkalisch-methanolischem Milieu

Die Umsetzung des Kreatinins mit Pikrinsäure im natronalkalisch-methanolischen Milieu erwies sich als vorteilhaft. Schon nach einer halben Minute begann die "Rote Substanz" auszufallen.
Die Ausbeute von 3,55 g entsprach bei Ausgangskonzentrationen von je 0,01 mol Kreatinin und Pikrinsäure 92% d.Th.

Zu 100 ml einer heißen methanolischen Pikrinsäure (4,6 g $C_6H_3N_3O_7$ • 50proz. H_2O ≙ 0,01 mol) gibt man unter Rühren je 100 ml methanolische NaOH (6,00 g ≙ 0,15 mol) und methanolische Kreatininlösung (1,13 g ≙ 0,01 mol) hinzu. Nach ca. 30 s beginnt ein feinkristalliner, blutroter Niederschlag auszufallen. Man läßt das Reaktionsgemisch unter stetigem Rühren noch 30 min am Sieden und anschließend erkalten. Die ausgefallenen Kristalle werden durch eine feinporige Glasfritte abfiltriert, je 3 mal mit je 30 ml absol. Methanol und danach mit je 30 ml Methylenchlorid oder Diethylether nachgewaschen, Bei 100° wird 30 min im Trockenschrank und dann bei 85° 5 h im Vakuum getrocknet.

Ausb. 3,55g = 92% d.Th.
Schmp. 198° (Zers.-P.)
$Na_2C_{10}H_8N_6O_8$ (386,2) Ber. C 31,1 H 2,09 N 21,7 Gef. C 30,0 H 2,96 N 20,0
pH-Wert der Reaktionslösung, gemessen mit einem pH-Meter E 512 der Fa. Metrohm, Herisau (CH): Gef. 13,50 Ber. 13,64

6.1.3 Herstellung von Kreatininpikrat (7)

Die Lösungen von Pikrinsäure (2,30 g $C_6H_3N_3O_7$ • 50proz. H_2O ≙ 0,005 mol) und Kreatinin (0,056 g ≙ 0,005 mol) in je 50 ml Methanol werden zum Sieden erhitzt und zusammengegossen. Nach ca. 5 min beginnt ein gelber, voluminöser Niederschlag auszufallen. Dieser wird nach dem Erkalten der Lösung durch eine feinporige Glasfritte abfiltriert, mit je 3 mal 30,0 ml absol. Methanol und Methylenchlorid gewaschen und 30 min bei 100° im Trockenschrank sowie 4 h bei 100° im Vakuum getrocknet.

6.2 Messung der UV/VIS-Absorption der MEISENHEIMER-Verbindung 2b

6.2.1 Messung in Wasser (Abb.26)

Beim Lösen der "Roten Substanz" in Wasser muß man sehr schnell vorgehen, da eine rasche Abnahme der anfänglichen Extinktion zu verzeichnen ist. Je nach Konzentration zeigt die Lösung eine orangerote bis blutrote Farbe.

λ_{max} 405 nm (ε) (14 500)
λ_{max} 484 nm (ε) (8 300)
$E_1 : E_2 = 1,7 : 1$

6.2.2 Messung in 20proz. NaOH (Abb.26)

Löst man die "Rote Substanz" in 20proz. NaOH, so ist eine Farbänderung der Lösung nach Gelb zu beobachten. Gleichzeitig findet man im Elektronenspektrum nur noch ein Absorptionsmaximum bei 384 nm.

λ_{max} 384 nm (ε) (7 000)

6.2.3 Messung in Methanol (Abb.27)

Das Elektronenspektrum zeigt ein Maximum bei 418 nm (ε=14900) mit einer Schulter bei 484 nm.

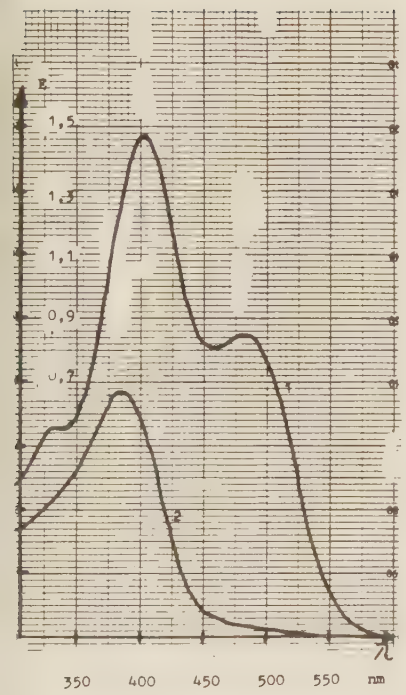


Abb.26: Elektronenspektrum von 2b
1 = 4 mg 2b in 100 ml H_2O
2 = 4 mg 2b in 100 ml 20proz. Natronlauge gelöst

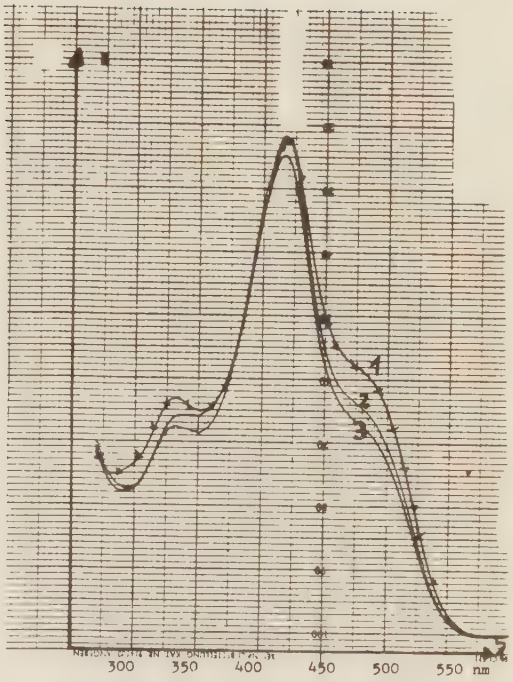
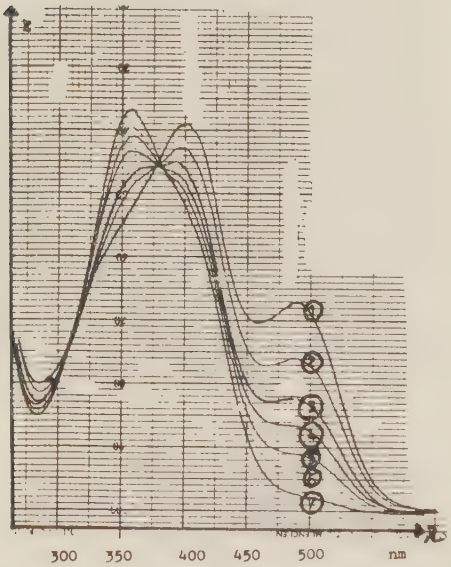


Abb.27: Elektronenspektrum von 2b
1 = 4 mg 2b in 100 ml Methanol gelöst
2 = Messung nach 10 min
3 = Messung nach 40 min

6.2.4 Messung der zeitlich fortschreitenden Zersetzung in Wasser (Abb.28)

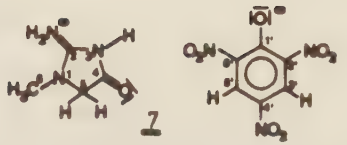
Löst man die "Rote Substanz" in Wasser und mißt die Extinktion der Lösung zu verschiedenen Zeiten, so stellt man eine starke Abnahme fest. Offensichtlich zersetzt sich die Verbindung im wäßrigen Milieu. Die MEISENHEIMER Kurve ① in Abbildung 28 geht über in eine Kurve ⑦ mit einem Absorptionsmaximum bei 358 nm.



Meßzeitpunkt:
1 = sofort nach dem Lösen
2 = nach 10 min
3 = nach 20 min
4 = nach 30 min
5 = nach 40 min
6 = nach 50 min
7 = nach 60 min

Abb. 28: Elektronenspektrum der "Roten Substanz" 2b in Wasser (c = 4 mg/100 ml)

6.3 Infrarot-Spektren



7

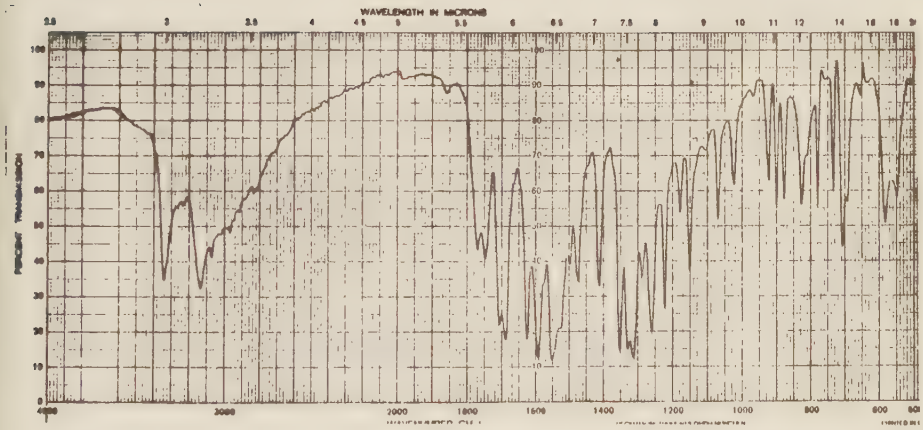


Abb.29: IR-Spektrum des Kreatininpikrats (7) in KBr

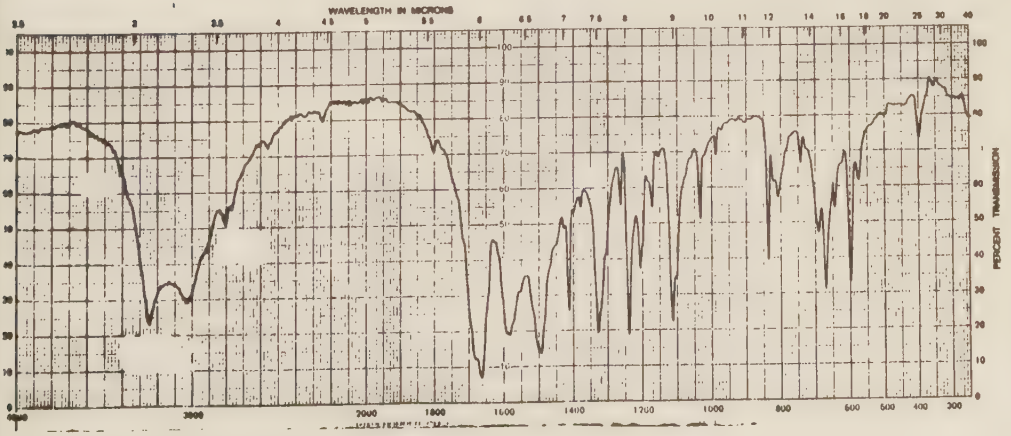
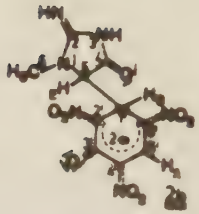


Abb.30: IR-Spektrum des Kreatinins (6) in KBr



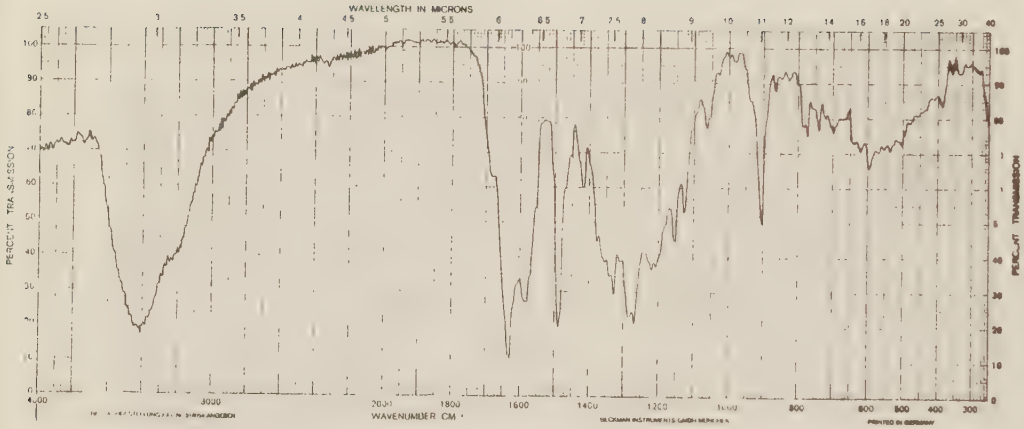


Abb.31: IR-Spektrum des Trinitrocyclohexadienat-Adduktes in KBr

Zu Abb.29:
IR(KBr): 3340 (NH), 3120 (CH), 1700 (CONH), 1550, 1320 (NO_2) [cm^{-1}]

Zu Abb.30:
IR(KBr): 3240 (NH), 3030 (CH), 1660 (CONH) [cm^{-1}]

Zu Abb.31:
IR(KBr): 3410 (OH), 1630 (CONH), 1490, 1290, 1270 (NO_2^-) [cm^{-1}]

6.4 Pipettierschema

6.4.1 Arbeitsvorschrift nach SCHMID

Arbeitsvorschrift für den enzymatischen Farbtest nach SCHMID

	Probe	Probenleerwert
wäßrige Kreatinin-lösung bzw. Urin	0,5 ml	0,5 ml
Enzymlösung 5 mg Creatininase/ ml Glycerin 50%	-	0,02 ml
Glycerin 50%	0,02 ml	-
	Inkubationszeit 10 min bei 30°C	
Pikrinsäurelösung 14 mmol/l	0,5 ml	0,5 ml
1M-Natronlauge	1,0 ml	1,0 ml
	Inkubationszeit 5 min bei 30°C	
NaH_2PO_4-Lösung 9%	1,0 ml	1,0 ml
	Messung der Extinktion der Probe gegen den Probenleerwert nach 2 min bei 484 nm (Meßtemperatur 30°C)	

6.4.2 Arbeitsvorschrift für den kombinierten Enzym-JAFFE-Farbtest nach LÖHBERG

	Probe [µl]	Referenz [µl]
wäßrige Kreatininlösung bzw. Serum	50	50
Enzym-Substrat-Mischung	50	50
Creatininase	-	5
Glycerinlösung 3,5%	5	-
Inkubationszeit 10 min bei 30°C		
Natronlauge 1N	200	200
Pikrinsäurelösung 14 mmol/l	100	100
Inkubationszeit 5 min bei 30°C		
Natriumdihydrogen-phosphatlösung 9%	200	200
nach 2 min Messung bei 484 nm/30°C		

Zusammensetzung der Enzym-Substrat-Mischung:

100 µl	SB 2
100 µl	EB 3
800 µl	H_2O
1000 µl	

Bei Raumtemperatur ist die Mischung ca. 3 Stunden haltbar.

6.4.3 Pipettierschema der neuen Methode

	Probe [µl]	Referenz [µl]
wäßrige Probenlösung	50	50
Enzym-Substrat-Puffer•-Gemisch (Verhältnis 1+1+8)	-	50
Puffer ($H_2O_{dem.}$: Puffer= 1:4)	50	-
Creatinin-Amidohydrolase	10	10
Inkubationszeit 10 min bei 30°C		
Natronlauge 1 mol/l	200	200
Pikrinsäure 14 mmol/l	100	100
Inkubationszeit 5 min bei 30°C		
Natriumdihydrogen-phosphatlösung 9%	200	200
Inkubationszeit 2 min bei 30°C, Messen bei 484 nm, 30°C		

Gesamtvolumen : 610 µl

Zeitbedarf (ohne Probenvorbereitung) : 17 Minuten

Eichgerade : y = 0,039 x + 0,001

$E^{1\%}_{1cm}$ (484 nm) : 473

• Puffer: BOEHRINGER-Puffer des Tests "Creatinin enzymatisch" (Bestell-Nr.: 166 413)

Enzymlösung = Flasche 3 des BOEHRINGER-Tests

Substratlösung = Flasche 2 des BOEHRINGER-Tests

6.5 Berechnung des Gesamtkreatiningehalts nach der neuen Methode

6.5.1 Angabe in mg/l verzehrfertige Zubereitung

$$\text{Kreatiningehalt} = \frac{(\Delta A - 0{,}001) \cdot p}{0{,}039 \cdot M} \quad [\text{mg/l}]$$

ΔA = Differenz der Absorption Probe - Referenz
p = g/l Produkt (lt. Gebrauchsanweisung)
M = Probenmenge in g (6.9.1.2)

6.5.2 Angabe in Gewichtsprozent

$$\text{Kreatiningehalt} = \frac{(\Delta A - 0{,}001) \cdot f}{0{,}039 \cdot m} \quad [\%]$$

ΔA = Differenz der Absorption Probe - Referenz
m = Probenmenge in mg (6.9.1)
f = 10 000 (6.9.1.1)
= 100 (6.9.1.2)

6.6 Eichgeraden

6.6.1 Eichgeradenerstellung nach der neuen Methode

Tab.19: Meßwerte für wäßrige Kreatininlösungen nach der neuen Methode

Kreatinin [mg/100 ml]	Extinktion bei 484 nm
0,00	0,000
0,50	0,019
1,00	0,039
2,00	0,077
3,00	0,114
4,00	0,160
5,00	0,194
6,00	0,236
8,00	0,312
10,00	0,390
12,00	0,460
14,00	0,545

Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Bestimmungen angegeben.
Die Eichgerade verläuft linear bis zu einer Kreatininkonzentration von 14 mg/100 ml (= 1238 µmol/l).

Gleichung der Eichgeraden : $y = 0,039 + 0,001$

Korrelation der Einzelwerte: $r^2 = 0,995$

$r = 0,997$

6.6.2 Eichgeradenerstellung nach der Methode HADORN

Tab.20: Eichgeradenmeßwerte nach der Methode HADORN

Kreatinin [µg/ml]	Extinktion bei 546 nm
1,00	0,024
3,00	0,063
5,00	0,105
7,00	0,145
10,00	0,208

6.7 Regressionsgeraden

6.7.1 Regressionsgerade der neuen Methode

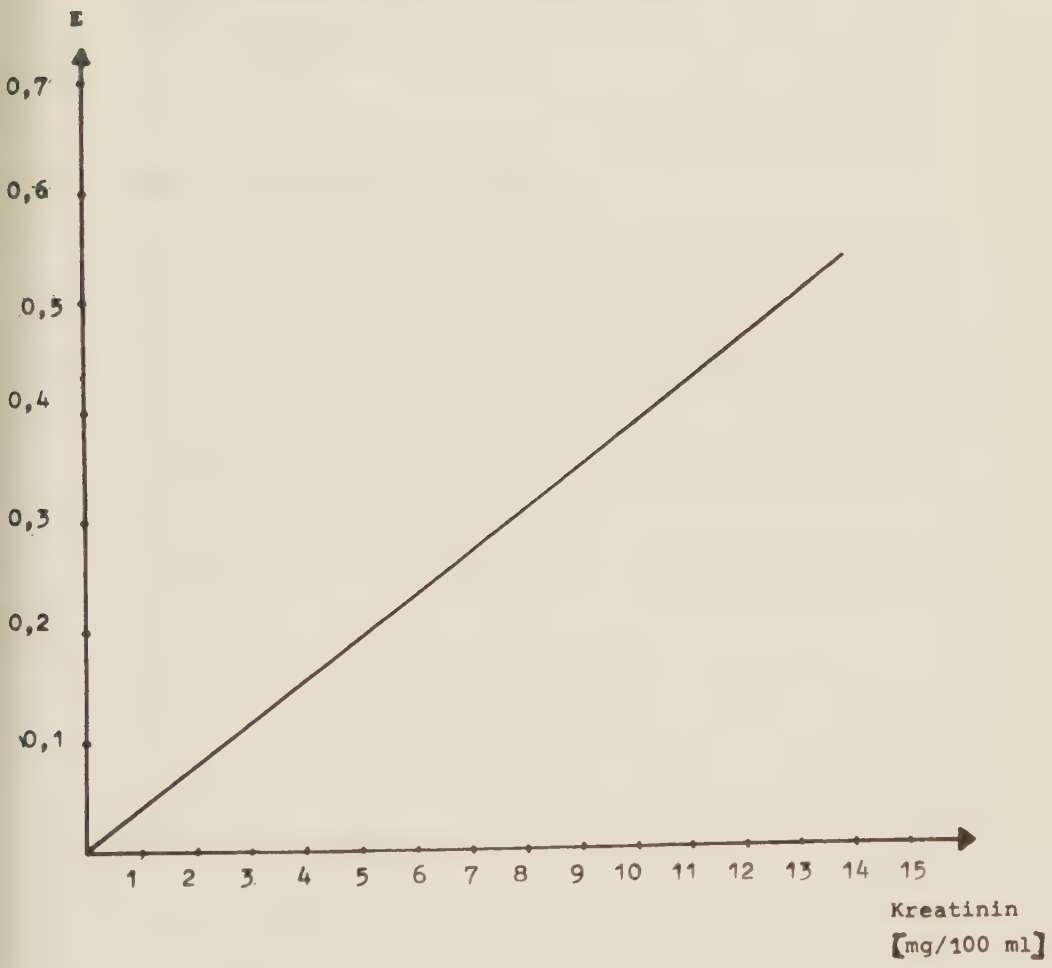


Abb.32: Eichgerade für eine wäßrige Kreatininlösung
$y = 0{,}039 + 0{,}001$
Korrelation: $r^2 = 0{,}995$, $r = 0{,}997$
Linearität bis mindestens 14 mg Gesamtkreatinin/100 ml

6.7.2 Eichgerade der wäßrigen Kreatininlösung nach der Methode HADORN

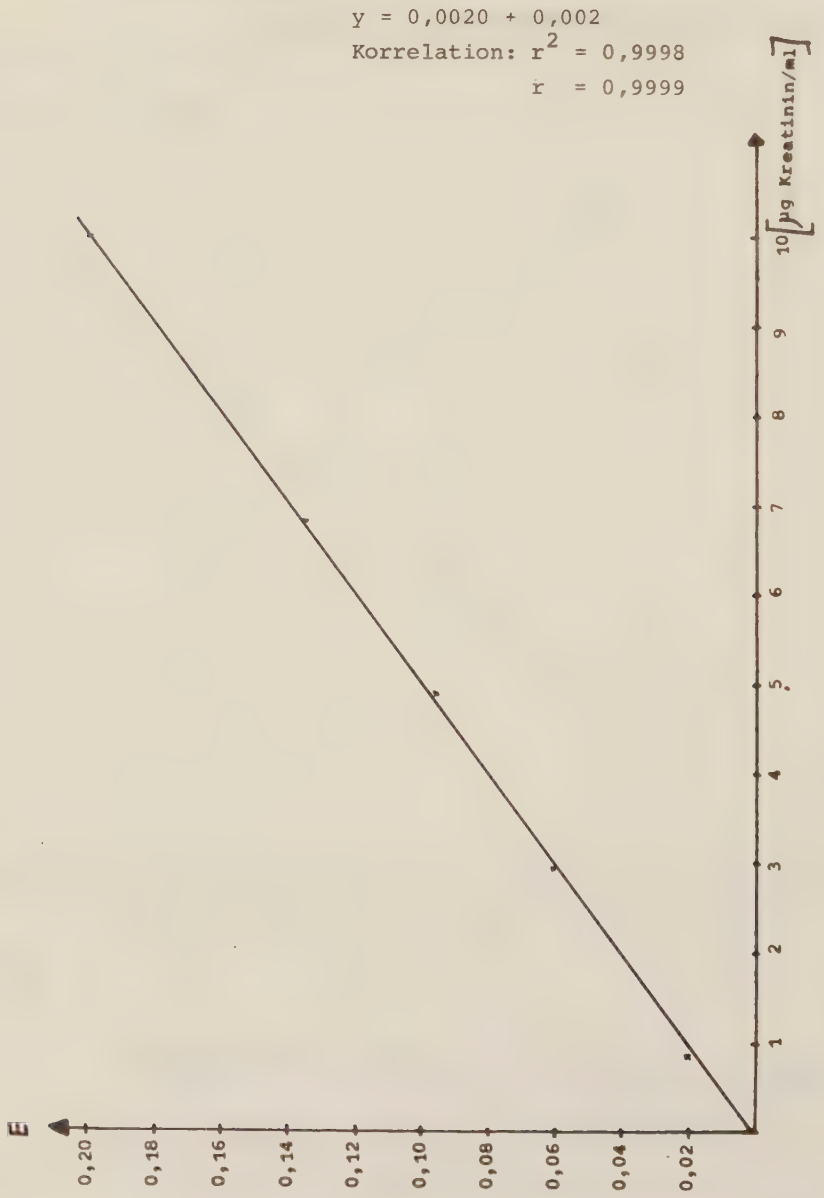


Abb.33: Eichgerade nach der Methode HADORN

6.8 Richtigkeit und Präzision

Zur Sicherung der Qualität der Ergebnisse quantitativer Bestimmungsmethoden muß eine Kontrolle in Hinblick auf Präzision (Reproduzierbarkeit) und Richtigkeit durchgeführt werden.

6.8.1 Bestimmung der Präzision

Die Präzision ist das wichtigste Kriterium für die Zuverlässigkeit einer Methode. Sie ist die Kenngröße der zufälligen Fehler. Diese sind dafür verantwortlich, daß bei wiederholter Bestimmung derselben Analyse trotz gleichbleibender Konzentration keine übereinstimmende Ergebnisse erzielt werden.
Eine ausreichende Präzision ist dann gegeben, wenn die relative Standardabweichung (Variationskoeffizient) 5% nicht überschreitet.
Berechnung von Standardabweichung und relativer Standardabweichung:

$$S = \pm\sqrt{\frac{(\bar{x} - x)^2}{n - 1}}$$

$$S_{rel} = VK = \frac{S \cdot 100}{\bar{x}} \left[\%\right]$$

S = Standardabweichung
x = Einzelwert
$\bar{x}$ = Mittelwert
n = Anzahl der Einzelwerte
S_{rel} = Relative Standardabweichung
VK = Variationskoeffizient

In der Praxis sind folgende Präzisionskontrollen üblich:

- Bestimmung der Präzision in der Serie
- Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag

6.8.1.1 Präzision in der Serie

n Bestimmungen einer Probe werden an einem Tag hintereinander durchgeführt.

a) Probe mit niedriger Gesamtkreatininkonzentration

Zahl der Bestimmungen: n = 20
Mittelwert der Extinktionen: E = 0,03565
= 0,899 mg Gesamtkreatinin/100 ml
= 7,947 µmol Gesamtkreatinin/100 ml
Standardabweichung der Extinktionen:
$S_E \pm$ = 0,0010894
= 0,007469 mg Gesamtkreatinin/100 ml
= 0,066028 µmol Gesamtkreatinin/100 ml
Relative Standardabweichung: S_{rel} = VK = 3,06%

b) Probe mit mittlerer Gesamtkreatininkonzentration

Zahl der Bestimmungen: n = 20
Mittelwert der Extinktionen: E = 0,226
= 5,81 mg Gesamtkreatinin/100 ml
= 51,361 µmol Gesamtkreatinin/100 ml
Standardabweichung der Extinktionen:
$S_E \pm$ = 0,0058938
= 0,1345 mg Gesamtkreatinin/100 ml
= 1,1890 µmol Gesamtkreatinin/100 ml
Relative Standardabweichung: S_{rel} = VK = 2,61%

c) Probe mit hoher Gesamtkreatininkonzentration

Zahl der Bestimmungen: n = 20
Mittelwert der Extinktionen: E = 0,362
= 9,32 mg Gesamtkreatinin/100 ml
= 82,39 µmol Gesamtkreatinin/100 ml
Standardabweichung der Extinktionen:
$S_E \pm$ = 0,0075761
= 0,1749 mg Gesamtkreatinin/100 ml
= 1,546 µmol Gesamtkreatinin/100ml
Relative Standardabweichung: S_{rel} = VK = 2,09%

6.8.1.2 Präzision von Tag zu Tag

Zur Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag wurde eine Probe fertig zubereitet und in Portionen zu 500 µl bei - 20°C eingefroren und gelagert. Täglich wurde eine Portion aufgetaut und der Untersuchung unterzogen.

Zahl der Bestimmungen : n = 20
Mittelwert der Extinktionen: E = 0,03645
Mittelwert Kreatinin : 9,32 mg/100 ml
Relative Standardabweichung: S_{rel} = VK = 2,81%

6.8.2 Bestimmung der Richtigkeit

Die Richtigkeit einer Methode gibt an, um wieviel ein einzelner Meßwert von der tatsächlichen, in der Untersuchungsprobe vorliegenden Menge abweicht. Sie ist die Kenngröße für den systematischen Fehler.
Für die Beurteilung der Richtigkeit gibt es verschiedene Methoden; wie Mischversuche oder Vergleichsversuche.

6.8.2.1 Mischversuche

Proben verschiedener Gesamtkreatininkonzentrationen werden miteinander gemischt.
Durchführung der Versuche:
Die Proben werden in gleichen Volumenverhältnissen gemischt, der Gehalt der Proben und ihrer Mischungen wird nach der Arbeitsvorschrift bestimmt. Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Messungen angegeben.

Tab.21: Ergebnisse der Mischversuche nach der neuen Methode

Probe	E	Gesamtkreatinin [mg/100 ml]	Gesamtkreatinin [µmol/100 ml]	Theorie [mg/100ml]	%d.Th.
1	0,072	1,84	16,3	--	-
2	0,195	5,01	44,3	--	-
3	0,121	3,10	27,4	--	-
4	0,112	2,87	25,4	--	-
5	0,161	4,13	36,5	--	-
1+2	0,136	3,49	30,9	3,43	101,7
2+4	0,155	3,98	35,2	3,94	101,0
3+5	0,139	3,57	31,6	3,61	98,9

Probe 1: klarer Bratensaft
Probe 2: klare Fleischsuppe
Probe 3: klarer Bratensaft
Probe 4: klare Fleischsuppe
Probe 5: klare Hühnersuppe

6.8.2.2 Vergleichsversuche

Vergleichsversuche verschiedener Proben wurden nach den Methoden SCHMID (Mikroverfahren), LÖHBERG sowie einer flüssigkeitschromatographischen (HPLC-Methode[40]) durchgeführt.

6.9 Probenvorbehandlung

6.9.1 Neue Methode

6.9.1.1 Fleischextrakt

Ca. 10 g Fleischextrakt, auf 1 mg genau gewogen, werden in einem Erlenmeyerkolben in ca. 100 ml heißem Wasser gelöst. Man erhitzt die Lösung 5 min zum Sieden. Nach dem Erkalten gießt man die Lösung in einen 1000,0 ml Meßkolben und füllt mit Wasser von 20°C bis zur Marke auf.
10,0 ml der 1000,0 ml Meßkolbenlösung werden in einen 100,0 ml Meßkolben überführt und mit Wasser von 20°C auf 100,0 ml aufgefüllt. Die eventuell getrübte Lösung wird durch ein trockenes Papierfilter filtriert. Die ersten Milliliter des Filtrats werden verworfen. Die restlichen Milliliter stellen die fertige Probelösung dar.

6.9.1.2 Klare Fleischsuppe, Bratensaft und gebundene Ochsenschwanzsuppe

Die Einwaage, auf 1 mg genau gewogen, (klare Fleischsuppe: 1,0 g, Bratensaft: 1,5 g, gebundene Ochsenschwanzsuppe: 2,0 g) wird in 50 ml warmem Wasser gelöst. Man erhitzt die Lösung ca. 2 min zum Sieden. Nach dem Abkühlen der Lösung wird sie in einen 100,0 ml Meßkolben überführt und mit Wasser von 20°C bis zur Marke ausgefüllt. Anschließend filtriert man durch ein halb mit Glasperlen gefülltes Papierfilter. Die ersten Milliliter des Filtrats werden verworfen. Die restlichen Milliliter der filtrierten Lösung stellen die fertige Probelösung dar.

6.9.2 Methoden SCHMID und LÖHBERG

6.9.2.1 Probenvorbereitung

a) Fleischextrakt

Ca. 10 g Fleischextrakt werden auf 1 mg genau gewogen. Die Probenmenge wird in einem 100 ml Erlenmeyerkolben in ca. 100 ml kochend heißem Wasser gelöst. Man erhitzt die Lösung 5 min zum Sieden. Nach dem Erkalten gießt man die Lösung in einen 1000,0 ml Meßkolben und füllt mit Wasser von 20°C bis zur Marke auf.
10,0 ml der 1000,0 ml Meßkolbenlösung gibt man in einen 100 ml Erlenmeyerkolben. Man fügt 10,0 ml Wasser und 4,7 g einer 37proz. HCl p.a. hinzu, so daß eine 7proz. HCl resultiert.

b) Klare Fleischsuppe, Bratensaft und gebundene Ochsenschwanzsuppe

Die Einwaage, auf 1 mg genau gewogen (klare Fleischsuppe: 1,0 g, Bratensaft: 1,5 g, gebundene Ochsenschwanzsuppe: 1,5 g) wird in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit 25,0 ml 7proz. HCl p.a. versetzt.

6.9.2.2 Säurekatalytische Umwandlung des Kreatin in Kreatinin

Die 7proz. salzsauren Gemische nach der Probenvorbereitung werden 1 h lang im siedenden Wasserbad erhitzt. Man läßt unter mehrmaligem Umschütteln erkalten und fügt 3 ml einer 9proz. NaH_2PO_4 hinzu. Die Lösung wird mit 7proz. NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Diese Lösung wird quantitativ in einen 100,0 ml Meßkolben überführt und bei 20°C mit Wasser auf 100,0 ml aufgefüllt. Für Fleischextrakt stellt diese Lösung die fertige Probenlösung dar.
Im Falle von klarer Fleischsuppe, Bratensaft und der gebundenen Ochsenschwanzsuppe filtriert man die Lösung durch ein halb mit Glasperlen von 3 mm Durchmesser gefülltes Papierfilter.

Die ersten Milliliter der filtrierten Lösung werden verworfen. Die restlichen Milliliter des Filtrats stellen die fertige Probenlösung dar.

6.10 Bestimmung des Gesamtkreatiningehaltes eines Fleischextraktes nach den Methoden SCHMID, LÖHBERG und der neuen Methode

6.10.1 Methode SCHMID (Mikro-Verfahren)

Anzahl der Bestimmungen : n = 6
Extinktion, Durchschnitt: x = 0,900
Gesamtkreatiningehalt : 715,2 mg/1000 ml Stammlösung
Auswertung nach der Eichgeraden für wäßrige Kreatininlösung
y = 0,125 + 0,006

Einwaage : 10,190 g homogenisierter Fleischextrakt
Gesamtkreatiningehalt in Prozent: 7,02%

6.10.2 Methode LÖHBERG

Anzahl der Bestimmungen : n = 7
Extinktion, Durchschnitt : x = 0,720
Gesamtkreatiningehalt : 717,8 mg/1000 ml Stammlösung
Auswertung nach der Eichgeraden für wäßrige Kreatininlösung
y = 0,100 + 0,002

Einwaage: 10,190 g homogenisierter Fleischextrakt
Gesamtkreatiningehalt in Prozent: 7,05%

6.10.3 Neue Methode

Anzahl der Bestimmungen : n = 8
Extinktion, Durchschnitt: x = 0,276
Gesamtkreatiningehalt : 710,2 mg/1000 ml Stammlösung

Auswertung nach der Eichgeraden für wäßrige Kreatininlösungen
y = 0,039 + 0,001

Einwaage: 10,109 g homogenisierter Fleischextrakt
Gesamtkreatiningehalt in Prozent: 7,00%

6.11 Bestimmung des Gesamtkreatiningehaltes einer klaren Fleischsuppe, eines Bratensaftes und einer gebundenen Ochsenschwanzsuppe

6.11.1 Bestimmung nach den Methoden SCHMID (Mikro), LÖHBERG und der neuen Methode

6.11.1.1 Klare Fleischsuppe

Gehalt an Gesamtkreatinin bestimmt in einem Ringversuch: 0,35 - 0,4%

Methode SCHMID (Mikro)
Einwaage : 1023,0 mg
Anzahl der Versuche : n = 4
Extinktion (Durchschnitt): 0,5025
Gesamtkreatinin : 3,972 mg
Prozentualer Gesamtkreatiningehalt: 0,388%

Methode LÖHBERG
Einwaage : 1023,0 mg
Anzahl der Versuche : n = 4
Extinktion (Durchschnitt): 0,418
Gesamtkreatinin : 4,160 mg
Prozentualer Gesamtkreatiningehalt: 0,407%

Neue Methode
Einwaage : 1053,9 mg
Anzahl der Versuche : n = 6
Extinktion (Durchschnitt): 0,169
Gesamtkreatinin : 4,308 mg
Prozentualer Gesamtkreatiningehalt: 0,409%

6.11.1.2 Bratensaft

Gehalt an Gesamtkreatinin, bestimmt in einem Ringversuch: 0,20 - 0,25%

Methode SCHMID (Mikro)
Einwaage : 1426,0 mg
Anzahl der Versuche : n = 4
Extinktion (Durchschnitt): 0,359
Gesamtkreatinin : 2,824 mg
Prozentualer Gesamtkreatiningehalt: 0,198%

Methode LÖHBERG
Einwaage : 1426,0 mg
Anzahl der Versuche : n = 4
Extinktion (Durchschnitt): 0,321
Gesamtkreatinin : 3,190 mg
Prozentualer Gesamtkreatiningehalt: 0,224%

Neue Methode
Einwaage : 1126,8 mg
Anzahl der Versuche : n = 6
Extinktion (Durchschnitt): 0,0995
Gesamtkreatinin : 2,547 mg
Prozentualer Gesamtkreatiningehalt: 0,226%

6.11.1.3 Gebundene Ochsenschwanzsuppe

Gehalt an Gesamtkreatinin, bestimmt in einem Ringversuch: 0,08 - 0,12

Methode SCHMID (Mikro)
Einwaage : 1278,1 mg
Anzahl der Versuche : n = 4
Extinktion (Durchschnitt) : 0,171
Gesamtkreatiningehalt : 1,320 mg
Prozentualer Gesamtkreatiningehalt: 0,103%

Methode LÖHBERG
Einwaage : 1278,1 mg
Anzahl der Versuche : n = 4
Extinktion (Durchschnitt): 0,141
Gesamtkreatinin : 1,390 mg
Prozentualer Gesamtkreatiningehalt: 0,109%

Neue Methode
Einwaage : 1440,3 mg
Anzahl der Versuche : n = 6
Extinktion (Durchschnitt): 0,056
Gesamtkreatinin : 1,425 mg
Prozentualer Gesamtkreatiningehalt: 0,099%

6.12 Bestimmung von 10 verschiedenen Proben nach der neuen Methode und Vergleich mit der Methode [40]

6.12.1 Extinktion und relative Standardabweichung

In Tabelle 22 wird der Vergleich der Variationskoeffizienten gezeigt, sowie die nach der neuen Methode gemessenen Extinktionen aufgeführt.

Tab.22: Extinktion und relative Standardabweichung

Probe	Extinktion	Extinktion	VK [%]	VK [%] HPLC[40]
(1)	0,368/0,371/0,375/0,379/0,383	0,375	1,79	0,7
(2)	0,438/0,440/0,440/0,440/0,451	0,442	1,32	0,8
(3)	0,467/0,467/0,473/0,475/0,477	0,472	1,09	1,0
(4)	0,487/0,492/0,498/0,501/0,513	0,498	2,22	0,7
(5)	0,178/0,179/0,179/0,184/0,185	0,181	2,00	0,8
(6)	0,342/0,344/0,348/0,350/0,360	0,349	2,24	0,6
(7)	0,398/0,400/0,421/0,424/0,432	0,415	4,09	1,0
(8)	-0,005/-0,002/0,001/0,004	--	0	0
(9)	0,340/0,348/0,351/0,365/0,366	0,354	3,46	1,6
(10)	0,437/0,438/0,441/0,444/0,458	0,444	2,14	0,9

6.12.2 Probenbehandlung

In Tabelle 23 wird die Entnahmemenge der Probenlösung aufgeführt.

Tab.23: Probenbehandlung der 10 Proben des Vergleichs der neuen Methode mit der HPLC-Methode[40)]

Probe	Entnahme in [ml]	aufgefüllt auf [ml]	Extinktion Durchschnitt
(1) Kreatin/Kreatinin	10	100	0,375
(2) Fleischextrakt Nr. 1	5	1000	0,442
(3) Fleischextrakt Nr. 2	5	1000	0,472
(4) Trinkbouillon	2	100	0,498
(5) Klare Fleischsuppe	10	100	0,181
(6) Bouillon	10	100	0,349
(7) Bratensaft	30	100	0,415
(8) Soße zum Braten	20	100	0
(9) Ochsenschwanzsuppe	30	100	0,354
(10) Kalbfleischsuppe	30	100	0,444

6.12.3 Vergleich der Gesamtkreatininwerte

In der Tabelle 24 werden die gefundenen Gesamtkreatininwerte aufgeführt.

Tab.24: Vergleich der Gesamtkreatininwerte

Probe	Gesamtkreatinin in [%] Enzymat.	HPLC	Unterschied in [%] Enzymat. zu HPLC
(1) Kreatin/Kreatinin	0,096	0,099	- 3,03
(2) Fleischextrakt 1	2,262	2,21	2,30
(3) Fleischextrakt 2	2,415	2,31	4,35
(4) Trinkbouillon	0,637	0,543	14,76
(5) Klare Fleischsuppe	0,046	0,0454	1,32
(6) Bouillon	0,089	0,0831	6,63
(7) Bratensaft	0,035	0,0371	- 5,66
(8) Soße zum Braten	0	0,002	--
(9) Ochsenschwanzsuppe	0,030	0,0307	- 2,28
(10) Kalbfleischsuppe	0,038	0,0397	- 4,28

6.13 Geräte

Schmelzpunktsbestimmung

Der Schmelzpunkt der Verbindung 2b wurde mit dem Kofler-Schmelzpunktsmikroskop der Firma Reichelt ermittelt und unkorrigiert angegeben.

Infrarotspektroskopie

Beckman Spectrometer 4250. Die Spektrenaufnahme erfolgte in KBr-Preßlingen.

Kernresonanzspektroskopie

80 MHz-^{1}H-Spektren:	Bruker WP 80, Meßtemperatur 28°C; Spektrenbreite 1250 Hz. Interner Standard war TMS bzw. das Signal des jeweils verwendeten Lösungsmittels.
20,115 MHz-^{13}C-Spektren:	Bruker WP 80, Meßtemperatur 28°C; Spektrenbreite 5000 Hz. Interner Standard war TMS bzw. das Signal des jeweiligen Lösungsmittels.

Die Steuerung des Kernresonanzspektrometers WP 80, die Spektrenakkumulation und Fourier-Transformation erfolgte mit der Computereinheit Bruker BNC 28.

90 MHz-^{1}H-Spektren:	Bruker HFX-90 Multikernspektrometer mit Datensystem Aspect 2000, Meßtemperatur 28°C.
400 MHz-^{1}H-Spektren:	Bruker WM 400, supraleitender Magnet mit angeschlossenem Computer Aspect 2000, Meßtemperatur 28°C.
100,57 MHz-^{13}C-Spektren:	Bruker WM 400, supraleitender Magnet mit einem angeschlossenen Computer Aspect 2000, Meßtemperatur 28°C.
Temperaturspektren:	Regeleinheit Bruker B-VT-1000. Die Kalibrierung der Temperatureinheit erfolgte mit Quecksilber- bzw. Alkoholthermometern der Firma Wilmad (5 mm).

Elementaranalyse

Die Elementaranalysen wurden am Chemischen Institut der Universität Tübingen gemacht.

Elektronenspektroskopie

Die Messungen wurden an einem Beckman Spectrometer Modell 24 in Quarzküvetten (Schichtdicke 1 cm) durchgeführt.

7 Literaturverzeichnis

1 W. Ettel und A. Tuor, Dtsch. Lebensm. Rundsch. 73, 357 (1977).

2 E. Buddecke, Grundriß der Biochemie, 5. Aufl. S. 458, Verlag Walter de Gruyter, Berin 1977.

3 J. Schormüller, Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 2. Aufl. S. 346, Springer-Verlag, Berlin 1974.

4 K.G. Bergner und H. Kiefer, Dtsch. Lebensm. Rundsch. 61, 118 und 378 (1965).

5 M. Jaffé, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 10, 391 (1886).

6 A. Ellinger, R. Seidel und K.-A. Kovar, Arch. Pharm. (Weinheim), 309, 603 (1976).

7 K. Kohashi, Y. Tsuruta, M. Yamaguchi und Y. Ohkura, Chem. Pharm. Bull. 27, 2122 (1979).

8 K.-A. Kovar und M. Schmid, Arch. Pharm. (Weinheim), 312, 780 (1979).

9 K.-A. Kovar und G. Löhberg, Arch. Pharm. (Weinheim), 313, 893 (1980).

10 A.W. Wahlefeld, G. Holz und H.U. Bergmeyer in H.U. Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse II, 3. Aufl., S. 1834, Verlag Chemie, Weinheim 1974.

11 E. Munz, E. Bernt und A.W. Wahlefeld, Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12, 259 (1974).

12 A.W. Wahlefeld, G. Herz und H.U. Bergmeyer, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 29, 126 (1972).

13 Boehringer Mannheim, Methoden der enzymatischen Lebensmittelanalytik, Boehringer Mannheim GmbH 1980.

14 R. Battaglia, Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. 68, 28 (1977).

15 A. Carisano, A. Bonecchi und M. Riva, J. Chromatogr. 45, 264 und 53, 517 (1970).

16 H. Hadorn, Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. 37, 342 (1946).

17 H.J. Hardon und H.K. Kok, Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. 53, 1 (1962).

18 R. Richterich, Klinische Chemie, 4. Aufl., S. 450, Verlag S. Karger AG, Basel 1978.

19 M. Staub, Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. 35, 47 (1944).

20 T. Sudendorf und O. Lahrmann, Z. Unters. Lebensm. 29, 1 (1915).

21 Th. v. Fellenberg, Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. 30, 220 (1939).

22 H. Bartels und M. Cikes, Clin. Chim. Acta 26, 1 (1969).

23 H.P. Seelig und H. Wüst, Ärztl. Lab. 15, 34 (1969).

24 M. Kimura, Pharm. Bull. 3, 81 (1955).

25 J. Vasiliades, Clin. Chem. 22, 1664 (1976).

26 T. Nambara, Bunseki Kagaku 13, 184 (1964).

27 K.-A. Kovar, G. Francas und R. Seidel, Arch. Pharm. (Weinheim) 310, 40 (1977).

28 K.-A. Kovar, Arch. Pharm. (Weinheim) 305, 379 (1972).

29 T. Kabeya, K. Kohashi, Y. Ohkura und T. Momose, Chem. Pharm. Bull. 21, 2168 (1973).

30 K. Kohashi, Y. Tsuruta und Y. Ohkura, Chem. Pharm. Bull. 25, 2127 (1977).

31 K. Kohashi, Y. Tsuruta und Y. Ohkura, Chem. Pharm. Bull. 26, 2914 (1978).

32 D.L. Fabiny und G. Ertingshausen, Clin. Chem. 17, 696 (1971)

33 H.P. Seelig, Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 7, 581 (1969).

34 K.-A. Kovar, Habilitationsschrift, Tübingen 1972.

35 Pretsch, Clerc, Seibl und Simon, Strukturaufklärung organischer Verbindungen, 2. Aufl., S. H25, Springer-Verlag, Berlin 1981.

36 E. Breitmaier und G. Bauer, ^{13}C-NMR-Spektroskopie, 1. Aufl., S. 176 und 332, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1977.

37 R.F. Dietrich, M.A. Marletta und G.L. Kenyon, Org. Magn. Reson. 13, 79 (1980).

38 Lit. [36] S. 299.

39 I.Schlecht, Dissertation, Tübingen 1983.

40 H. Müller, V. Siepe und W. Stadelmann, Dtsch. Lebensmittel-Rdsch. 79, 395 (1983).

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Professor Dr. K.-A. Kovar waren die Herren Professoren und Dozenten:

H. Auterhoff, J. Schultz	(Pharmazeutische Chemie)
E. Graf, H. Hamacher	(Pharmazeutische Technologie)
H.P.T. Ammon	(Pharmakologie)
E. Reinhard	(Pharmazeutische Biologie)
K. Botzenhart	(Hygiene)

Lebenslauf

Name:	Klaus-Peter Johannes Rupp
Geburtstag:	31.1.1957
Geburtsort:	Schwäbisch Gmünd
Eltern:	Rudolf Rupp, Oberlehrer und Isolde Rupp, geb. Bauer, Oberlehrerin

Schulischer Werdegang

Grundschule:	Klösterleschule Schwäb. Gmünd 1964 bis 1967
Gymnasium:	Parler-Gymnasium Schwäb. Gmünd 1967 bis 1976
Abitur:	10. Juni 1976

Beruflicher Werdegang

Studium der Pharmazie:	Universität Tübingen April 1977 bis September 1980
Praktische Ausbildung:	Rathaus-Apotheke Stuttgart-Hedelfingen Oktober 1980 bis März 1981 Pharmazeutisches Institut der Universität Tübingen April 1981 bis September 1981
Pharmazeutische Prüfung:	
1. Abschnitt	16. März 1979
2. Abschnitt	8. September 1980
3. Abschnitt	15. Oktober 1981
Approbation als Apotheker	November 1981
Beginn und Abschluß der vorliegenden Arbeit:	April 1981 bis Dezember 1983
Wiss. Hilfskraft:	April 1981 bis März 1983 und Juli 1983 bis Oktober 1983
Wiss. Angestellter:	April 1983 bis Juni 1983

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45